

Institute of Complex Systems
Zelluläre Biophysik (ICS-4)

Analyse der Dynamik zellulärer Calcium Signale mit spezifisch lokalisierten Sensorproteinen

Annika Christina Meisenberg

Analyse der Dynamik zellulärer Calcium Signale mit spezifisch lokalisierten Sensorproteinen

Annika Christina Meisenberg

Berichte des Forschungszentrums Jülich; 4369
ISSN 0944-2952
Institute of Complex Systems
Zelluläre Biophysik (ICS-4)
Jül-4369

D 38 (Diss., Köln, Univ., 2013)

Vollständig frei verfügbar im Internet auf dem Jülicher Open Access Server (JUWEL)
unter <http://www.fz-juelich.de/zb/juwel>

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461 61-5220 · Telefax: 02461 61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Zusammenfassung

Calcium (Ca^{2+}) ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff, der eine Vielzahl zellulärer Reaktionen reguliert bzw. moduliert. In vielen physiologischen Prozessen spielen vor allem lokale Änderungen der Calciumkonzentration eine Schlüsselrolle. Die experimentelle Aufklärung der zeitlichen und räumlichen Dynamik solcher Signale ist eine Voraussetzung, intrazelluläre Signalverarbeitungsprozesse und den Einfluss von Ca^{2+} auf diese Prozesse besser zu verstehen. Daher gewinnt die optische Darstellung von Ca^{2+} Signalen immer mehr an Bedeutung. Als optische Ca^{2+} Indikatoren standen bis vor kurzem nur synthetische, Ca^{2+} -sensitive Farbstoffe wie z.B. Fluo-4 oder Fura-2 zur Verfügung. Alternativ werden seit einigen Jahren genetisch kodierte Ca^{2+} Indikatoren z.B. GCaMP3.0 eingesetzt. Die Expression von GCaMP3.0 in eukaryotischen Zellen führt zu einer homogenen Verteilung des Proteins im Zytoplasma. Um lokale Ca^{2+} Signale in verschiedenen subzellulären Kompartimenten messen zu können, wurde GCaMP3.0 in dieser Arbeit gezielt gentechnisch modifiziert. Durch das Anfügen kurzer Lokalisierungssequenzen gelang es das Sensorprotein an die Plasmamembran, in die Matrix und die Außenmembran von Mitochondrien sowie in den Golgi-Apparat zu lenken. Zusätzlich wurde eine GCaMP3.0 Variante untersucht, die vorwiegend nukleär lokalisiert ist.

Die biophysikalische Charakterisierung der Sensorvarianten zeigte, dass die Fluoreszenzeigenschaften *in vitro* durch das Anfügen zusätzlicher Peptidsequenzen nicht beeinträchtigt werden. Darüber hinaus wurden HEK293-Zellen als Modellsystem für die genaue Analyse der subzellulären Lokalisierung und Funktionalität von GCaMP3.0 verwendet. Die modifizierten Varianten sollten weiterhin genutzt werden, um die räumliche und zeitliche Dynamik von Ca^{2+} Signalen in Neuronen zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die modifizierten GCaMP3.0 Konstrukte daher in einen Vektor kloniert, mit dem rekombinante Adeno-assoziierte Viren (rAAV) verschiedener Serotypen hergestellt werden konnten. Diese rAAV eignen sich als Genfähren, um GCaMP3.0 in kultivierten kortikalen Neuronen funktionell zu exprimieren. Die spezifische Lokalisierung der GCaMP3.0 Varianten sowohl in HEK293-Zellen als auch in kortikalen Neuronen ermöglichte die zeitaufgelöste Messung lokaler Ca^{2+} Signale.

Abstract

Calcium (Ca^{2+}) is an essential second messenger that regulates and modulates a variety of cellular functions. In particular, local changes of the calcium concentration play a key role in physiologically relevant processes. The elucidation of temporal and spatial dynamics underlying Ca^{2+} signaling will improve knowledge to understand intracellular signaling mechanisms and the impact of Ca^{2+} on such mechanisms. Therefore, imaging of Ca^{2+} signals is an important field of current investigation. Until recently, synthetic Ca^{2+} -sensitive dyes were the only available agents to visualize Ca^{2+} dynamics in living cells. Nowadays genetically encoded Ca^{2+} indicators, e.g. GCaMP3.0, are often used as an alternative to monitor calcium signaling.

The expression of GCaMP3.0 in eukaryotic cells mainly leads to a homogenous, cytosolic distribution of the protein. To enable the measurement of localized Ca^{2+} signals in different subcellular compartments, the GCaMP3.0 encoding gene was genetically modified as a part of this thesis. Adding short targeting motifs to GCaMP3.0 led to specific subcellular distribution of the protein either in the plasma membrane, the mitochondrial matrix or the mitochondrial outer membrane as well as the golgi apparatus. Additionally, another sensor variant was targeted to the nucleus. Any impairment of the fluorescence properties of the modified sensor proteins was ruled out by *in vitro* biophysical characterization. Furthermore, HEK293 cells were used as a model system to investigate the spatial localization and functionality of modified as well as non-modified GCaMP3.0. Apart from that, the targeted GCaMP3.0 variants were designed to study temporal and spatial Ca^{2+} dynamics in neurons. Therefore the genes encoding the modified GCaMP3.0 variants were used to generate recombinant Adeno-associated viruses. These viruses were used as gene ferries to deliver GCaMP3.0 variants to primary cultures derived from rat cortex. In both cell types, HEK293 cells and rat cortical neurons, the targeted sensor variants allowed time resolved measurements of localized Ca^{2+} signals.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Ca ²⁺ Signalwege.....	1
1.2 Analyse von Ca ²⁺ Signalen	4
1.2.1 Synthetische Ca ²⁺ -sensitive Farbstoffe	4
1.2.2 Genetisch kodierte Calcium Indikatoren.....	5
1.2.3 GCaMP Sensor Familie.....	8
1.3 Adeno-assoziierte Viren.....	10
1.4 Zielsetzung	12
2 Material und Methoden	13
2.1 Material	13
2.2 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)-Zellkultur	13
2.2.1 Bakterienstämme und Plasmidvektoren	13
2.2.2 Zusammensetzung und Herstellung des Kulturmediums für <i>E. coli</i>	15
2.2.3 Anzucht von <i>E. coli</i> Bakterienkulturen	15
2.2.4 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation von Plasmid-DNA	15
2.3 Präparation von Plasmid-DNA	16
2.3.1 Minipräparation	16
2.3.2 Maxipräparation	16
2.4 Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	16
2.4.1 DNA-Größen- und Mengenstandard	17
2.4.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren mit Hilfe von Agarosegelen.....	17
2.4.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	17
2.4.4 Isolierung von DNA-Fragmenten.....	18

2.5	Manipulation von Nukleinsäuren	18
2.5.1	Restriktion von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen	18
2.5.2	Dephosphorylierung von Plasmid Vektoren	18
2.5.3	Ligation von DNA-Fragmenten	19
2.5.4	Transformation	19
2.5.5	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	19
2.5.5.1	Bedingungen der PCR-Reaktionen	19
2.5.5.2	Verwendete Oligonukleotide (Primer).....	20
2.5.5.3	Auffüllen überhängender Einzelstrang-Enden.....	20
2.5.5.4	Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA Fragmenten	20
2.5.6	DNA-Sequenzierung	20
2.5.7	Semi-quantitative PCR (sqPCR)	21
2.5.7.1	Präparation von RNA.....	21
2.5.7.2	Reverse Transkription	21
2.6	Präparation, Trennung und Nachweis von Proteinen.....	21
2.6.1	Überexpression von rekombinanten Proteinen	21
2.6.2	Reinigung von 6x His-Fusionsproteinen.....	22
2.6.3	Quantifizierung von Proteinen mit der Bradford- Methode.....	23
2.6.4	Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese.....	24
2.6.5	Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie Blau	25
2.7	HEK293-Zellkultur	26
2.7.1	Allgemeine Zellkulturtechniken.....	26
2.7.1.1	Sterilarbeit.....	26
2.7.1.2	Bestimmung der Zellzahl.....	26
2.7.1.3	Kultivierung der Zellen.....	26
2.7.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	27
2.7.1.5	Transiente, heterologe Expression von Proteinen in HEK 293-Zellen.....	27

2.7.1.6	Stabile Transfektion von HEK293-Zellen	28
2.7.1.7	Vereinzelung von Zellklonen.....	29
2.7.2	Herstellung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren (rAAV)	29
2.7.2.1	Transfektion	29
2.7.2.2	Ernte und Aufschluss der Zellen.....	30
2.7.2.3	Aufreinigung von rAAV durch Dichtegradientenzentrifugation	31
2.7.2.4	Titerbestimmung von rAAV	31
2.7.2.4.1	Real Time PCR.....	32
2.7.2.4.2	Auswertung.....	33
2.7.2.4.3	Schmelzkurve der PCR-Fragmente	34
2.7.2.5	Infektion von Kulturzellen mit rAAV.....	34
2.8	Immunfärbungen	35
2.8.1	Mito-Tracker® Färbung	35
2.8.2	Immunzytochemie	35
2.9	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	37
2.10	Spektroskopische Analyse von GCaMP3.0 Varianten.....	38
2.11	Calcium-Fluorimetrie	39
2.12	Ca ²⁺ Imaging	39
2.12.1	Zwei-Photonen <i>Laser-Scanning</i> Mikroskopie.....	40
2.12.2	Funktionsweise des Messstandes	41
2.12.3	Messung und Auswertung	43
2.13	Software	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Detektion von Ca ²⁺ Signalen mit Fluo-4 und GCaMP3.0.....	46
3.2	Herstellung und Expression von spezifisch lokalisierten GCaMP3.0-Varianten	49
3.2.1	Klonierung der GCaMP3.0-Varianten	49
3.2.2	Subzelluläre Verteilung der GCaMP3.0-Varianten	51

3.3	Spektroskopische Charakterisierung der GCaMP3.0 Varianten	58
3.3.1	Expression und Reinigung der GCaMP3.0 Varianten	58
3.3.2	<i>In vitro</i> Charakterisierung der GCaMP3.0 Varianten	59
3.3.3	Einfluss des pH-Wertes auf die Fluoreszenzeigenschaften von mtGCaMP3.0	61
3.4	Funktionelle Charakterisierung spezifisch lokalisierter GCaMP3.0 Varianten in HEK293-Zellen	62
3.4.1	HEK293-Zellen als Modellsystem zur Charakterisierung von GECIs.....	62
3.4.2	Herstellung stabil transfizierter GCaMP3.0 Zelllinien	64
3.4.3	Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit verschiedenen GCaMP3.0 Varianten.....	69
3.4.4	Analyse der räumlich-zeitlichen Dynamik von Ca^{2+} Signalen mit verschiedenen GCaMP3.0 Varianten in HEK293-Zellen	75
3.5	AAV-vermittelte Expression von GCaMP3.0 Varianten in einer kortikalen Primärkultur	78
3.5.1	Testtransduktion kortikaler Primärzellen	78
3.5.2	Expression von GCaMP3.0 Varianten in kortikalen Neuronen	81
3.5.3	Messung lokaler Ca^{2+} Signale in kortikalen Neuronen	83
4	Diskussion	86
4.1	Herstellung spezifisch lokalisierter GCaMP3.0 Varianten	86
4.2	Charakterisierung der GCaMP3.0 Varianten	90
4.3	Analyse der räumlich-zeitlichen Dynamik von Ca^{2+} Signalen in verschiedenen Zelltypen	94
4.4	Ausblick	98
5	Literaturverzeichnis.....	99
6	Anhang	113
6.1	Verwendete Primer.....	113
6.2	Sequenzen	115
6.2.1	Sequenz von GCaMP3.0-CaaX.....	116

6.2.2 Sequenz von GCaMP3.0-10aa-CaaX	116
6.2.3 Sequenz von GCaMP3.0-28aa-CaaX	117
6.2.4 Sequenz von GAP43-28aa-GCaMP3.0 (pmGCaMP3.0)	117
6.2.5 Sequenz von COXVIII-GCaMP3.0 (mtGCaMP3.0).....	118
6.2.6 Sequenz von Tom20-GCaMP3.0 (momGCaMP3.0)	118
6.2.7 Sequenz von Bcl-2-GCaMP3.0 (golgiGCaMP3.0)	119
6.2.8 Sequenz von Lck-GCaMP3.0.....	119
6.2.9 Sequenz von SV40NLS-GCaMP3.0 (nucGCaMP3.0).....	120
6.3 Sequenzalignments.....	120
6.3.1 Histaminrezeptor H1 (Hrh1)	120
6.3.2 Histaminrezeptor H3 (Hrh3)	121
6.3.3 Lck-GCaMP3.0	121
6.4 Ca^{2+} -Titration von GECI.....	122
6.5 Charakterisierung von GCaMP3.0 Varianten in HEK293-Zellen	125

Abkürzungsverzeichnis

#	Nummer
$[Ca^{2+}]_e$	freie Calcium Konzentration im Extrazellulärraum
$[Ca^{2+}]_{frei}$	freie Calcium Konzentration in der Küvette
$[Ca^{2+}]_i$	freie Calcium Konzentration im Zytoplasma einer Zelle
~	ungefähr
α	anti
AAV	Adeno-assoziierte Viren
Abb.	Abbildung
AM	Acetoxymethylester
BBS	BES gepufferte Saline
BES	N,N,-bis-(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca^{2+}	Calcium
CaM	Calmodulin
cap	virales Capsidprotein
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ch	Huhn
CMV	Zytomegalie Virus
cp	zirkulär permutiert
CT	Chemiblocker mit Triton-X100
C-Terminus	Carboxylterminus einer Polypeptidkette
CY3	Carbocyanin-Derivat
cyt	zytosolisch lokalisiert
d	Esel
VI	

d.h.	das heißt
DAG	Diacylglycerol
ΔF	Änderung des Fluoreszenzsignals
DF	Durchfluss
$\Delta F/F_0$	Änderung der gemessenen Fluoreszenz im Verhältnis zur Basalfluoreszenz
DIV	Tag <i>in vitro</i> (<i>day in vitro</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DmOctaR1b	Octopaminrezeptor 1b aus <i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
DW-Kurve	Dosis-Wirkungs-Kurve
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-Aminoethyl)-N, N, N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES	Extrazellulär-Lösung
et al.	<i>et alii</i> , und andere
F_0	Basalfluoreszenz
FCCP	Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon
F_{\max}	Maximaler gemessener Fluoreszenzwert
F_{\min}	Minimaler gemessener Fluoreszenzwert

FRET	Foerster Resonanz Energie Transfer
g	Schwerebeschleunigung (im Durchschnitt $9,81 \text{ m s}^{-2}$)
GAP43	wachstumsassoziiertes Protein 43, Neuromodulin
GECI	Genetisch kodierte Calcium Indikator (<i>genetically encoded Ca^{2+} indicator</i>)
GFAP	Saures Gliafaserprotein (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
golgi	am Golgiapparat lokalisiert
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren (<i>G-protein coupled receptor</i>)
G-Protein	Guanosintriphosphat (GTP)-bindendes Protein
gt	Ziege
H ₂ O	Wasser
HBS	HEPES gepufferte Saline
HEK293-Zellen	menschliche embryonale Nierenzelllinie 293 (<i>human embryonic kidney cell line 293</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HRH1	Histaminrezeptor H1
HRH3	Histaminrezeptor H3
i.d.R.	in der Regel
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
ITR	<i>inverted terminal repeats</i>
LB	Luria-Bertani
M	Marker
m	Maus
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (<i>microtubule-associated protein 2</i>)
MEM	<i>minimal essential medium</i>
VIII	

mITR	<i>mutated inverted terminal repeats</i>
MLCK	Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (<i>myosin light chain kinase</i>)
mom	an der mitochondrialen Außenmembran lokalisiert
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mt	in der mitochondrialen Matrix lokalisiert
MWP	Multiwellplatte
n	Stichprobenumfang
NB-Medium	Neurobasal [®] -Medium
Ni ²⁺	Nickel
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
N-Terminus	Aminoterminal einer Polypeptidkette
nuc	nukleär lokalisiert
OD	optische Dichte
p.a.	<i>pro analysi</i>
PA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphat gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PLL	Poly-L-Lysin
pm	an der Plasmamembran lokalisiert
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
rAAV	rekombinante Adeno-assoziierte Viren
rb	Kaninchen
RE	Rohextrakt
rep	virales Replikationsprotein

RFP	rot fluoreszierendes Protein (<i>red fluorescent protein</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>Region of Interest</i>
RT	Raumtemperatur
Σ	Summe
s.	siehe
s.a.	siehe auch
sc	selbstkomplementär (<i>self-complementary</i>)
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sq	semi quantitativ
SR	Sacropasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	TRIS-Bor-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA Puffer
TMA	Transmembrananker
TMD	Transmembrandomäne
TnC	Troponin C
TRIS	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
trs	<i>terminal resolution site</i>
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
ÜK	über Nacht Kultur
UV-Licht	ultraviolettes Licht
v/v	Volumenprozent
vgl. X	vergleiche

w/v	Gewichtsprozent
WF	Waschfraktion
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Abkürzungen von Einheiten

g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Microgramm, Nanogramm
h, min, s	Stunde, Minute, Sekunde
kDa	Kilodalton
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Microliter
M, mM, µM, nM	Molar, Millimolar, Micromolar, Nanomolar
mA	mAmpere
mol	Mol
rpm	Umdrehungen pro Minute
U	Units
V	Volt

Nukleotide innerhalb einer Nukleinsäuresequenz sind durch den Anfangsbuchstaben der Base bezeichnet (A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin).

Aminosäuren werden durch den Einbuchstabencode abgekürzt.

1 Einleitung

Die Fähigkeit zur Kommunikation ist eine Voraussetzung für das Überleben von Organismen, denn sie schafft die Grundlage spezifisch auf Veränderungen von Umweltbedingungen zu reagieren. Dies trifft nicht nur auf die Kommunikation zwischen Individuen zu, sondern auch innerhalb eines Organismus auf der Ebene von Organen, Geweben und Zellen. Als kleinste Einheit können Zellen unterschiedliche externe Signale registrieren, interpretieren und in spezifische Reaktionen umwandeln. Die Natur hat für diese anspruchsvolle Aufgabe vier verschiedene Systeme entwickelt: Benachbarte Zellen können über *gap junctions* oder interagierende Oberflächenmoleküle direkt miteinander kommunizieren. Eine weitere Möglichkeit der interzellulären Kommunikation ist durch das parakrine System gegeben, indem Zellen Effektormoleküle sezernieren, die zu benachbarten Zellen diffundieren. Darüber hinaus sind sowohl das Nervensystem, in dem physikalische oder chemische Signale in Aktionspotentiale werden, als auch das endokrine System, in dem Hormone zur Kommunikation eingesetzt werden, in der Lage, Signale in kurzer Zeit über weite Entfernungen zu transportieren (Alberts et al., 2008).

Trotz ihrer unterschiedlichen Mechanismen teilen die beschriebenen Signalwege ein gemeinsames Prinzip: externe Signale lösen intrazelluläre Signalkaskaden aus, die der Zelle zur Verarbeitung und Interpretation des Stimulus dienen. Die Hauptkomponenten in solchen Signalkaskaden sind meist membranständige Proteine und kleine Moleküle, sogenannte sekundäre Botenstoffe (Alberts et al., 2008). Einer dieser Botenstoffe ist Calcium (Ca^{2+} , Berridge et al., 2000; Clapham, 2007). Dieses bivalente Kation spielt in vielen Signalverarbeitungsprozessen eine entscheidende Rolle. Ein besseres Verständnis der komplexen, intrazellulären Prozesse, die auf der Dynamik von Ca^{2+} beruhen, wird dazu beitragen, auch die funktionelle Vielfalt zellulärer Interaktionen besser zu verstehen.

1.1 Ca^{2+} Signalwege

Ca^{2+} ist ein universeller sekundärer Botenstoff, welcher eine Vielzahl von zellulären Reaktionen auf externe Stimuli induziert und reguliert. Die freie Calcium Konzentration im Zytoplasma einer Zelle ($[\text{Ca}^{2+}]_i$; $\leq 1 \mu\text{M}$) ist im Vergleich zur extrazellulären Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_e$; 2-5 mM) sehr niedrig (Clapham, 2007, Alberts et al., 2008). Die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ legt daher den Grundstein für Ca^{2+} -basierte Signalwege. Die Vielseitigkeit der

ausgelösten zellulären Reaktionen wird dabei durch die Dauer und Amplitude der Erhöhung sowie durch das räumlich-zeitliche Muster der Ausbreitung kodiert. So sind manche Ca^{2+} Signale sehr lokal und zeitlich stark begrenzt, z.B. die sogenannten Ca^{2+} Sparks oder Puffs (Berridge, 2006). Andere Ca^{2+} Signale basieren auf Oszillationen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oder bilden Wellen, die sich über die gesamte Zelle ausbreiten können (Lechleiter et al., 1991; Parker and Yao, 1991; Woods et al., 1986). Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bewirken oftmals die Aktivierung von Ca^{2+} Bindeproteinen, die wiederum die Eigenschaften von nachgeschalteten Effektormolekülen regulieren und so z.B. im Zellkern die Transkription bestimmter Gene kontrollieren (Bengtson and Bading, 2012; Clapham, 2007, Abb. 1-1).

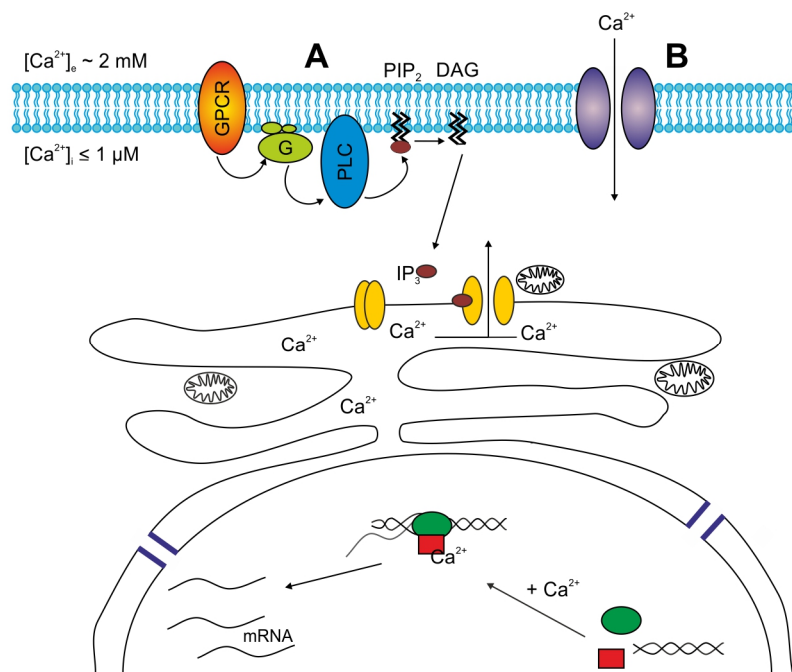


Abb. 1-1: Komponenten von Ca^{2+} -basierten Signalwegen zur Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist mit $\leq 1 \mu\text{M}$ im Vergleich zur $[\text{Ca}^{2+}]_e$ sehr niedrig. Um die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu erhöhen gibt es verschiedene Möglichkeiten. **(A)** Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) interagieren in Folge ihrer Aktivierung durch die Bindung eines Liganden mit G-Proteinen. Dadurch werden diese aktiviert, sodass die α -Unterheit des G-Proteins dissoziiert und ihrerseits die Phospholipase C (PLC) stimuliert. Dieses Enzym spaltet das membranverankerte Substrat Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). DAG verbleibt in der Membran, während IP_3 in der Zelle diffundiert und an ionotrope, ER-ständige IP_3 -Rezeptoren bindet (gelb). Dies führt zur Öffnung dieses Ca^{2+} -permeablen Ionenkanals, durch den Ca^{2+} aus dem ER in das Zytoplasma strömt. **(B)** Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} entlang elektro-chemischen Potentials durch Ca^{2+} -permeable Kanäle, wie z.B. spannungsaktivierte Ca^{2+} Kanäle. Die erhöhte Ca^{2+} Konzentration führt zur Aktivierung von Proteinen, die wiederum weitere Zielproteine regulieren, u.a. Ca^{2+} -abhängige Transkriptionsfaktoren im Zellkern.

Transiente Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ können durch Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern entstehen. In einer Vielzahl von Signalprozessen wird Calcium Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3)-abhängig aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) freigesetzt (Bootman et al., 2001; Abb. 1-1A). Zunächst werden G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G-protein coupled receptor*, GPCR) durch die Bindung eines Liganden aktiviert. Dies bewirkt eine Interaktion mit GTP-bindenden Proteinen (G-Proteine). Diese Interaktion aktiviert die α -Untereinheit des G-Proteins (Gudermann et al., 1996; Gudermann et al., 1997). Die α -Untereinheit wiederum stimuliert Phospholipase C (Rhee and Bae, 1997), ein Enzym, welches membran-gebundenes Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP_2) in IP_3 und Diacylglycerol (DAG) spaltet. DAG verbleibt in der Membran verankert, während IP_3 frei durch die Zelle diffundiert und an ionotrope IP_3 -Rezeptoren in der Membran des ER binden kann. Die Bindung von IP_3 an den Rezeptor induziert die Öffnung des Ca^{2+} -permeablen Ionenkanals und Ca^{2+} fließt aus dem ER ins Zytoplasma. Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ ist der Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} durch spannungsaktivierte oder ligandengesteuerte Ca^{2+} Kanäle in der Plasmamembran (Berridge et al., 2000; Abb. 1-1B).

In hohen Konzentrationen ist Ca^{2+} toxisch für Zellen, denn es bindet nur schwach an Wasser und kann deshalb physiologisch relevantes Phosphat präzipitieren. Um Schäden durch zu hohe $[Ca^{2+}]_i$ zu verhindern, verfügt die Zelle über effiziente Mechanismen das überschüssige Ca^{2+} aus dem Zytoplasma zu entfernen, z.B. die Bildung von Chelatkomplexen, Kompartimentalisierung in Ca^{2+} Speichern oder der Transport von Ca^{2+} aus der Zelle (Clapham, 2007). Die Ca^{2+} Homöostase im Zytoplasma wird durch ATPasen in der Plasmamembran (Jensen et al., 2004) bzw. in der ER-/SR- Membran (sacroplasmatisches Retikulum, Higgins et al., 2006) aufrecht erhalten. Darüber hinaus besitzen auch Mitochondrien Ca^{2+} Puffer Eigenschaften (Walsh et al., 2009). Werden große Mengen Ca^{2+} aus dem ER freigesetzt bilden sich sogenannte ER-Mitochondrien-Mikrodomänen. Beide Organelle sind in diesen Bereichen in engem, räumlichen Kontakt, sodass die Mitochondrien große Mengen an Ca^{2+} aufnehmen können. Das Ca^{2+} geben die Mitochondrien wieder ab, sobald sich das Ca^{2+} Niveau im Zytoplasma normalisiert hat. Anschließend wird das Ca^{2+} in das ER oder aus der Zelle transportiert (Csordas et al., 2010; Giacomello et al., 2010; Rizzuto and Pozzan, 2006).

Schon anhand dieser ersten Beschreibung Ca^{2+} -abhängiger Signalprozesse kann man erkennen, dass es sich um ein komplexes System handelt, in dem das Wechselspiel von globalen und lokalen Ca^{2+} Ereignissen von besonderer Bedeutung ist. Diese dynamischen Prozesse genau zu untersuchen ist wichtig, um intrazelluläre Signalverarbeitungsprozesse

noch besser zu verstehen. Allerdings sind für solche Studien geeignete Ca^{2+} Sensoren notwendig.

1.2 Analyse von Ca^{2+} Signalen

Fluoreszenz-basierte Imaging Experimente bieten eine sehr gute Möglichkeit die räumliche und zeitliche Dynamik von sekundären Botenstoffen zu beobachten. Das gilt insbesondere für Ca^{2+} Ionen. Optische Indikatoren für Ca^{2+} können in zwei Gruppen unterteilt werden: synthetische Verbindungen und genetisch kodierte Indikatoren.

1.2.1 Synthetische Ca^{2+} -sensitive Farbstoffe

Um Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu beobachten werden, Ca^{2+} -sensitive Farbstoffe eingesetzt. Zwei häufig benutzte Farbstoffe zur optischen Darstellung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sind Fluo-4 (Gee et al., 2000) und Fura-2 (Grynkiewicz et al., 1985). Der Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4-AM ist ein Derivat des Chromophors Oregon Green 488 (Abb. 1-2A, grün hinterlegt), welches wiederum ein Derivat von Fluorescein ist, das mit zwei Fluoratomen an den Positionen 2 und 7 modifiziert wurde. Eine EGTA-ähnliche Struktur dient als Ca^{2+} Bindedomäne (Abb. 1-2A, rot hinterlegt).

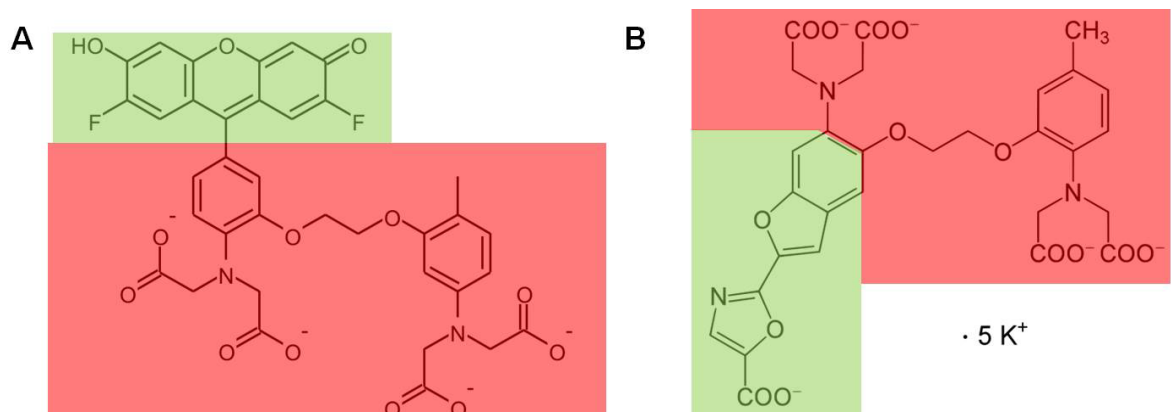


Abb. 1-2: Chemische Struktur von Fluo-4 (A) und Fura-2 (B). Beide Farbstoffe sind in der Ca^{2+} -freien Konformation dargestellt. Die EGTA-ähnlichen Strukturen sind rot unterlegt. Die Chromophore sind grün hinterlegt. Die Farbstoffe haben Anregungsmaxima bei 435 nm (Fluo-4) oder bei 340 und 380 nm (Fura-2). Die Emission wird bei 510 nm gemessen.

AM steht für die chemische Modifikation des Farbstoffs mit einem Acetoxymethylester. Diese Modifikation erhöht die Membranpermeabilität des Farbstoffs. Im Zytoplasma werden die AM-Gruppen durch unspezifische Esterasen hydrolysiert (Tsien, 1981). Fluo-4 kann entweder durch ein Photon mit hoher Energie (z.B. 488 nm) oder, wie in der 2-Photonen Mikroskopie, durch zwei Photonen mit niedriger Energie (z.B. 920 nm) angeregt werden. Der Farbstoff emittiert bei ~510 nm in Anwesenheit von Ca^{2+} 5-50-mal stärker als in der Ca^{2+} -ungebundenen Form. *In vitro* beträgt die Ca^{2+} Affinität von Fluo-4 345 nM.

Fura-2 enthält ebenfalls eine EGTA-ähnliche Struktur als Ca^{2+} Chelator-Domäne (Abb. 1-2B, rot hinterlegt). Das Chromophor basiert auf einer Stilbenstruktur. Stilbene sind aromatische Kohlenwasserstoffverbindungen, in denen ein Ethen und ein Benzolring verbunden sind (Abb. 1-2, grün hinterlegt). Fura-2 besitzt zwei Anregungsmaxima (340 nm und 380 nm). Die Fluoreszenzemission erfolgt bei 510 nm. Während Fura-2 in Anwesenheit von Ca^{2+} bei 340 nm stärker absorbiert, sinkt die Absorption von Fura-2 bei 380 nm. Daher kann das Verhältnis der Emissionsspektren, die aus der Anregung bei 340 nm und 380 nm resultierten, verwendet werden, um $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zu quantifizieren. *In vitro* ist die Affinität von Fura-2 für Ca^{2+} (224 nM) höher als die von Fluo-4.

Synthetische Ca^{2+} -sensitive Farbstoffe wurden in zahlreichen *in vitro* (Yuste et al., 1992) und *in vivo* (Fetcho et al., 1998; Yuste et al., 1992) Experimenten verwendet. Die Anwendung solcher Farbstoffe stößt jedoch an ihre Grenzen: (1) Synthetische Ca^{2+} -sensitive Farbstoffe werden weder zelltypspezifisch noch von subzellulären Kompartimenten exklusiv aufgenommen. (2) Der Beladevorgang mit synthetischen Farbstoffen kann Zell- bzw. Gewebeschäden verursachen. (3) Langzeitstudien in kultivierten Zellen oder im lebenden Tier sind limitiert, da Farbstoffe meist zytotoxisch wirken oder wieder aus den Zellen exportiert werden. Eine Alternative diese Probleme zu umgehen, ist die Verwendung eines genetisch kodierte Ca^{2+} Indikators.

1.2.2 Genetisch kodierte Calcium Indikatoren

Genetisch kodierte Ca^{2+} Indikatoren (*genetically encoded Ca^{2+} indicators*, GECI) basieren auf Ca^{2+} Bindeproteinen wie Troponin C (TnC; Heim and Griesbeck, 2004) oder Calmodulin (CaM, Miyawaki et al., 1997; Nakai et al., 2001), die mit einem optischen Reporterelement verbunden sind, welches wiederum aus fluoreszierenden Proteinen besteht. Die Bindung von Ca^{2+} an das Detektorprotein führt zu einer Konformationsänderung des Reporterelements. Die daraus resultierende Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des optischen Reporters können

gemessen werden. Eine weitere Komponente eines GECI kann ein Bindepartner für CaM sein, z.B. das M13 Peptid, welches mit Ca^{2+} -gebundenem CaM interagiert. Solche zusätzlichen Elemente können die Konformationsänderung des optischen Reporters noch verstärken (Miyawaki et al., 1997).

Es gibt zwei GECI Familien. Die Unterscheidung basiert darauf, ob das optische Reporterelement aus einem einzelnen fluoreszierenden Protein (FP) oder aus einem FRET Donor/Akzeptor FP-Paar besteht, dessen Anregungs- und Emissionswellenlängen überlappen. Bei Sensoren, in denen das Donor-/Akzeptor-Paar räumlich sehr nah zueinander angeordnet ist, kann nach der Anregung des Donors die Energie strahlungsfrei auf den Akzeptor übertragen werden und ihn dadurch anregen. Dieser Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) wird zum Beispiel in Troponin C basierten Sensoren (Mank et al., 2006; Mank et al., 2008; Abb. 1-3A) oder in CaM/M13 basierten Cameleon Sensoren genutzt (Horikawa et al., 2010; Miyawaki et al., 1997; Miyawaki et al., 1999; Abb. 1-3B). Die Bindung von Ca^{2+} führt zu einem Anstieg der FRET Effizienz, die fluoreszenzmikroskopisch gemessen wird.

In der Familie der GECI, die auf einzelnen Fluoreszenzproteinen basieren, besteht das optische Reporter Element entweder aus zirkulär permutierten (*circularly permuted*, cp) oder zweigeteilten Fluoreszenzproteinen (Nagai et al., 2001). Beinahe alle Sensoren aus dieser Familie nutzen die Ca^{2+} -induzierte Interaktion von CaM mit dem M13 Peptid, um eine Konformationsänderung des Fluoreszenzproteins zu bewirken. Diese erzeugt eine Änderung der spektralen Eigenschaften des Fluoreszenzproteins, sodass Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]$ als Zu- oder Abnahme der Fluoreszenzemission gemessen werden können. Ein häufig verwendeter Vertreter dieser Familie ist GCaMP (Abb. 1-3C). Dieses Sensorprotein wird im folgenden Kapitel näher beschrieben.

GECI bieten die Chance die Anwendungsgrenzen von synthetischen Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffen zu überwinden. Es ist möglich GECI in spezifischen Zelltypen und subzellulären Kompartimenten zu exprimieren (Borghuis et al., 2011; Miyawaki et al., 1997). Weiterhin wurden GECI bereits für Langzeitstudien in lebenden Organismen und Geweben verwendet. Sie wurden u.a. erfolgreich im Säugetier Herz und Gehirn (Mank et al., 2008; Mao et al., 2008; Petreanu et al., 2012; Tallini et al., 2006; Tian et al., 2009) sowie im Antennallobus von *Drosophila* und in *C. elegans* (Tian et al., 2009) eingesetzt. Doch auch GECIs bergen einige Probleme, die es zu lösen gilt. So sind synthetische Farbstoffe den Sensorproteinen im Signal-Rausch-Verhältnis, in der Kinetik, in der Linearität des Signals sowie in der Photostabilität und der Ionenselektivität (Mank et al., 2008; Tsien, 1999) überlegen. Weiterhin nimmt die

Proteinstabilität und die Fluoreszenzintensität vieler GECI unter physiologischen Temperaturen ab (Nakai et al., 2001). Darüber hinaus können intrazelluläre Signalwege durch Interaktionen von endogenen Ca^{2+} -bindenden Proteinen mit dem Ca^{2+} -sensitiven Element des GECI gestört werden oder die Überexpression von CaM verursacht Probleme durch seine Funktion als Ca^{2+} Puffer (Hasan et al., 2004; Palmer et al., 2006). Letzteres trifft allerdings auch auf Ca^{2+} -sensitive Farbstoffe zu.

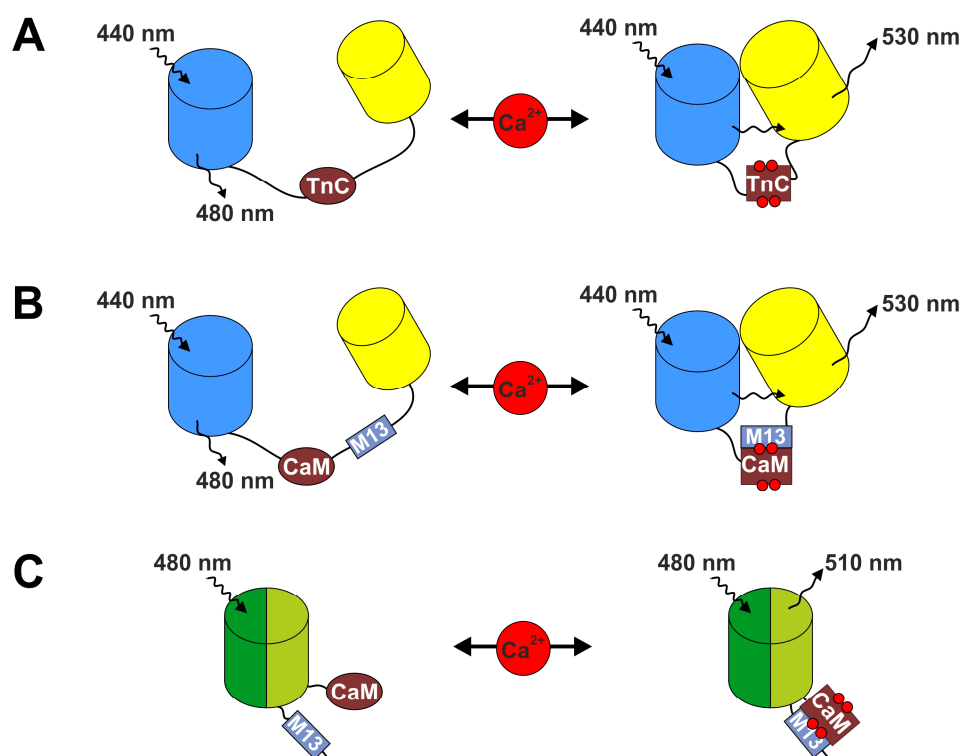


Abb. 1-3: Schematische Darstellung verschiedener GECI. (A) Mitglieder der Tn-Sensorfamilie enthalten das Ca^{2+} Bindeprotein Troponin C, welches von einer CFP- (blau) und einer YFP-Variante (gelb) flankiert wird. Tn-Sensoren werden mit der Anregungswellenlänge von CFP (440 nm) angeregt. YFP wird in diesem Wellenlängenbereich nicht angeregt. Im Ca^{2+} -ungebundenen Zustand emittiert CFP bei 480 nm. Bindet Ca^{2+} an TnC, ändert dieses seine Konformation und bringt die FPs nahe zueinander. Nun kann FRET stattfinden und YFP emittiert Photonen, die bei 530 nm detektiert werden können. (B) Die Ca^{2+} Affinität von Cameleon Sensoren wird durch die Interaktion von CaM und dem M13 Peptid vermittelt. Ansonsten funktioniert diese Sensor Familie wie Mitglieder der Tn-Familie. (C) GCaMP besteht aus einem zirkulär permutierten EGFP (cpEGFP, dunkel- und hellgrün), das N-terminal von dem M13 Peptid und C-terminal von CaM flankiert wird. GCaMP wird mit 480 nm angeregt. Durch die Bindung von Ca^{2+} ändert sich aufgrund der Interaktion zwischen CaM und M13 die Konformation des cpEGFP, wodurch GCaMP bei 510 nm emittiert. Die Übersicht wurde nach Hires et al., 2008 modifiziert.

Kürzlich wurde eine verbesserte GCaMP Variante, GCaMP3.0, generiert (Tian et al., 2009). Diese Variante verfügt im Vergleich zu ihren Vorläufern über eine höhere Basalfluoreszenz, eine höhere Ca^{2+} -abhängige Änderung der Fluoreszenz sowie über ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis.

1.2.3 GCaMP Sensor Familie

Der Ca^{2+} Sensor GCaMP (Nakai et al., 2001) basiert auf einem cpEGFP. Der neue C-Terminus (Abb. 1-4A, Aminosäuren 1-144, dunkelgrün) ist über einen kurzen Linker mit CaM verbunden (Abb. 1-4A und B). CaM ist ein hantelförmiges Protein mit flexiblen Verbindungen in seiner Mitte (Meador et al., 1992). Das Protein besitzt insgesamt vier Ca^{2+} Bindestellen, die sogenannten EF-Hände. Bindet CaM Calcium-Ionen, ändert es seine Konformation. Hydrophobe Bereiche werden dadurch exponiert und können amphipathische Abschnitte von Zielproteinen binden (Mori et al., 2000). Ein gut charakterisierter Interaktionspartner von CaM ist die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK; Adelstein and Eisenberg, 1980; Kamm and Stull, 1985). Die CaM-Bindestelle aus MLCK wurde isoliert, für Bindungsstudien mit CaM verwendet und erhielt den Namen M13 Peptid (Edelman et al., 1985). Dieses 21 Aminosäuren lange Peptid wurde als neuer N-Terminus an das cpEGFP angefügt (Abb. 1-4A). Es dient als Verstärker der Konformationsänderung des GCaMP-Proteins. Durch die Permutation des EGFPs wird die Umgebung des Chromphors chemisch verändert, sodass das Chromphor in einem protonierten Zustand vorliegt und keine Fluoreszenz emittiert wird. Die durch die Interaktion von CaM und M13 initiierte Konformationsänderung stellt den ursprünglichen Protonierungsstatus wieder her, sodass die EGFP-Fluoreszenz detektiert wird (Akerboom et al., 2009; Baird et al., 1999; Nagai et al., 2001; Nakai et al., 2001; Wang et al., 2008).

Die Funktionalität von GCaMP1.0 wurde in Fliegen, Würmern und Mäusen gezeigt (Ji et al., 2004; Reiff et al., 2005; Suh et al., 2004; Wang et al., 2003). Diese GCaMP Variante hat einen EC_{50} für Ca^{2+} von 235 nM und einen dynamischen Bereich ($F_{\text{max}}/F_{\text{min}}$) von 4,5. GCaMP1.0 besitzt jedoch einige Nachteile. Der Sensor ist pH sensitiv, faltet sich unvollständig bei physiologischen Temperaturen und verfügt über eine geringe Fluoreszenzintensität (Nakai et al., 2001; Ohkura et al., 2005; Tallini et al., 2006).

Um diese Probleme zu lösen, wurden durch Kombination von gerichteten und ungerichteten Mutagenese-Ansätzen die Varianten GCaMP1.6 (Ohkura et al., 2005) und GCaMP2.0 (Tallini et al., 2006) konstruiert. Die Punktmutationen V163A und S175G hatten einen

positiven Einfluss auf die Temperaturstabilität, die Fluoreszenzintensität und die Ionenselektivität (Ohkura et al., 2005). Zusätzlich zu diesen Mutationen wurden in GCaMP2.0 zwei weitere Mutationen eingeführt, die sowohl die Dimerisierung des Sensors verhinderten, als auch die Fluoreszenzintensität weiter erhöhten (D180Y und V93I, Abb. 1-4A, Tallini et al., 2006; Zacharias et al., 2002). Darüber hinaus enthält GCaMP2.0 eine kurze Sequenz unmittelbar vor dem M13 Peptid, welche aus dem pRSET-Expressions Vektor stammt (Abb. 1-4A). Diese Sequenz erhöht nochmals die Proteinstabilität. Für den EC_{50} von GCaMP2.0 für Ca^{2+} wurden unterschiedliche Ergebnisse berichtet: 146 nM (Tallini et al., 2006) bzw. 660 nM (Tian et al., 2009). Der dynamische Bereich von GCaMP2.0 ist mit 4,0 nur wenig kleiner als der von GCaMP1.0.

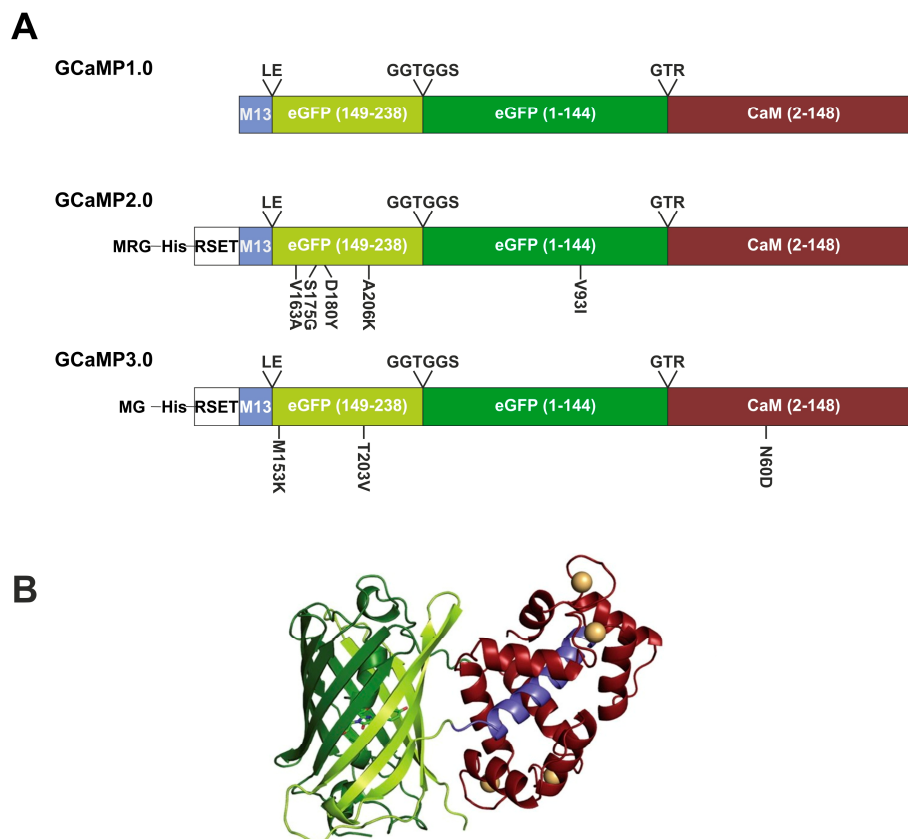


Abb. 1-4: Überblick der strukturellen Eigenschaften einiger GCaMP Sensoren. (A) Schematische Darstellung von GCaMP1.0, 2.0 und 3.0. GCaMP1.0 war der erste GCaMP Sensor. GCaMP2.0 wurde ausgehend von GCaMP1.0 teils durch gerichtete und teils durch ungerichtete Mutagenese generiert. Die Mutationen sind in die Schemazeichnung der Domänen eingetragen. GCaMP3.0 basiert auf GCaMP2.0. Anhand der in (B) gezeigten Kristallstruktur von GCaMP2.0 (modifiziert nach Wang et al., 2008) wurden in GCaMP3.0 gerichtete Mutationen eingefügt, die die Proteineigenschaften verbessern sollten. Der durch die Permutation neuentstandene N-Terminus des cpEGFP ist hellgrün dargestellt, der C-Terminus dunkelgrün. Das M13 Peptid ist blau angefärbt und CaM dunkelrot.

Obwohl der Sensor erfolgreich in Modellorganismen angewendet wurde (Chalasani et al., 2007; He et al., 2008), wurden weitere Modifikationen vorgenommen. Die Veröffentlichung der Kristallstruktur von GCaMP2.0 (Akerboom et al., 2009; Wang et al., 2008) ebnete den Weg für die weitere Optimierung des Sensors, aus der schließlich GCaMP3.0 resultierte (Abb. 1-4A). Das Arginin an Position 3 des Gesamtproteins wurde deletiert, was zu einer verbesserten Proteinstabilität führte. Das Methionin an Position 153 in cpEGFP (N-Terminus), das laut Auswertung der Kristallstrukturdaten Einfluss auf die Thermostabilität von GCaMP haben sollte, wurde gegen ein Lysin ausgetauscht. Das Threonin an Position 203 in derselben EGFP-Domäne liegt in der Nähe des Chromophors. Durch den Austausch dieser Aminosäure gegen Valin wurde der dynamische Bereich (~ 12) sowie die Basalfluoreszenz verbessert. Weiterhin wurde berichtet, dass eine Mutation in der ersten EF-Hand (N60D) die Eigenschaften von GCaMP3.0 so veränderte, dass es sogar kleine Änderungen der $[Ca^{2+}]$ detektieren kann (Tian et al., 2009). GCaMP3.0 ist ein geeignetes Werkzeug, um intrazelluläres Ca^{2+} zu beobachten.

1.3 Adeno-assoziierte Viren

GECI sind eine attraktive Alternative, um die Verteilung von Botenstoff Molekülen und die Änderung ihrer Konzentration in einzelnen Zellen und auch im lebenden Organismus zu beobachten. Um die Sensorproteine in dem entsprechenden System zu exprimieren, können rekombinante Adeno-assoziierte Viren (rAAV) als Genfähren genutzt werden. AAV wurden zuerst in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts isoliert (Atchison et al., 1965; Atchison et al., 1966; Hartley and Rowe, 1960). Sie wurden in einer Präparation des Affen Adenovirus Typ 15 entdeckt und als „kleine DNA-enthaltende Partikel“ beschrieben. Als die Forscher versuchten die AAV Partikel zu kultivieren gelang ihnen das nur in der Gegenwart eines Adenovirus. Aus diesem Grund erhielten die AAV ihren Namen und werden der Familie der Dependoviren zugerechnet (Hoggan et al., 1966).

Bis heute werden AAV als nicht pathogen für den Menschen bewertet (Monahan and Samulski, 2000). Es werden 14 verschiedene AAV Serotypen unterschieden. Serotypen unterscheiden sich anhand der Proteinzusammensetzung des Capsids, d.h. der Virushülle. Die Serotypen bedingen unterschiedliche Virustropismen, d.h. jeder AAV Serotyp infiziert präferentiell bestimmte Zellen oder Gewebe. Wahrscheinlich findet der Virus über Rezeptor-vermittelte Endocytose den Weg in die Zelle. Dieser Mechanismus ist für den Serotypen 2 (AAV-2) am besten untersucht. Nachdem der Virus von einer Zelle aufgenommen wurde, gibt

es zwei mögliche Infektionswege. Wenn AAV in der Abwesenheit von Helferviren Zellen infizieren, wird der Virus in das Genom des Wirts integriert (Kotin et al., 1991). Nur wenn die Zellen mit einem Helfervirus infiziert werden, z.B. mit einem Adenovirus, wird die AAV DNA repliziert und somit die Reproduktion eingeleitet.

Ein intaktes Wildtyp AAV (wt-AAV) Genom besteht aus einem etwa 4700 Nukleotide langen DNA-Einzelstrang. Es enthält zwei Gene, die, aufgrund verschiedener offener Leseraster, vier Replikationsproteine (rep) und drei Capsidproteine (cap) kodieren. Das Genom wird von sogenannten *inverted terminal repeats* (ITR) flankiert (Lusby et al., 1980). Eine ITR besteht aus 145 Nukleotiden, die einen kurzen, komplementären DNA Doppelstrang bilden können, sogenannte *Hairpin* Regionen. Die ITR spielen eine wichtige Rolle für die Replikation des viralen Plasmids, dienen aber auch als Signal für die Verpackung der viralen DNA in das Capsid (Berns et al., 1988, Zhou and Muzyczka, 1998). Das AAV Genom enthält keine genetische Information für eine DNA Polymerase. Daher muss die Synthese eines DNA Doppelstrangs durch die Wirts-Polymerase geschehen. Das 3'-Ende des viralen Genoms, welches am Ende einer der beiden ITR lokalisiert ist, dient als Primer für die Synthese des komplementären DNA Strangs. Dieser wird zur Transkription und somit zur viralen Proteinexpression benötigt (Brister and Muzyczka, 2000).

Das AAV Genom kann so modifiziert werden, dass es anstatt der wt-Gene ein oder sogar mehrere Transgene unter der Kontrolle eines ebenfalls eingefügten Promotors enthält (Abb. 1-5A). Nur die maximale Kapazität des wt-Genoms darf nicht überschritten werden.

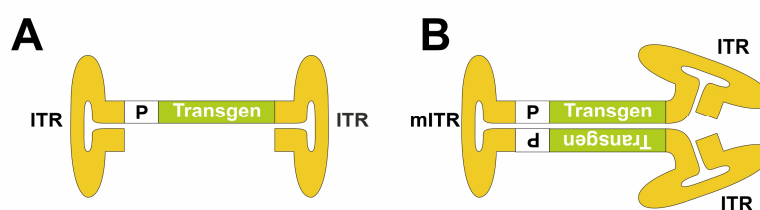


Abb. 1-5: Schematische Darstellung des AAV Genoms (A). Einzelsträngiges rAAV Genom mit zwei wt-ITR (gelb) und einem Transgen (grün) unter der Kontrolle eines ebenfalls eingefügten Promotors (P, weiß). **(B)** scAAV Genom mit zwei wt-ITR und einer mITR. In dieser selbstkomplementären (sc) Form bildet die DNA nach Freisetzung aus dem Capsid einen Doppelstrang, der sofort transkribiert werden kann. Die Farbkodierung entspricht der Teilabbildung (A).

Der in dieser Arbeit verwendete virale Vektor ist *self complementary* (scAAV). Eine der ITR ist mutiert (mITR). In jeder ITR Region befinden sich zwei Thymidinbasen zwischen denen

die rep Proteine einzelne Strangbrüche einfügen können. Diese Region wird *terminal resolution site* (trs) genannt. Die Deletion dieser Region in einer der beiden ITR verhindert das Einfügen des Strangbruchs während der DNA-Synthese. Das Ergebnis ist eine DNA Sequenz, die eine mITR in der Mitte und je eine wt-ITR an jedem Ende des Genoms enthält (Abb. 1-5B). Somit ist die DNA bereits doppelsträngig, sodass sie direkt für die mRNA Synthese benutzt werden kann (McCarty et al., 2001).

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll der genetisch kodierte Calcium Indikator GCaMP3.0 durch das Anfügen kurzer Signalsequenzen so modifiziert werden, dass das Sensorprotein an bzw. in unterschiedliche subzelluläre Kompartimente und an die Plasmamembran gelenkt wird. Die spezifische Lokalisierung von GCaMP3.0 soll die Messung lokaler Ca^{2+} Signale ermöglichen. Die modifizierten Varianten sollen hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften und ihrer Funktionalität in verschiedenen Systemen charakterisiert und sowohl mit dem unmodifizierten GCaMP3.0 Protein als auch mit synthetischen Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffen verglichen werden.

Als Modellsystem zur Charakterisierung der modifizierten Sensorvarianten werden HEK293 Zellen benutzt. Weiterhin sollen die Proteine in einer neuronalen Primärkultur exprimiert werden. Zu diesem Zweck werden GCaMP3.0 Varianten kodierende AAV als Genfähren verwendet. Die lokalisierten GCaMP3.0 Varianten sollen schließlich genutzt werden, um die räumliche und zeitliche Dynamik von Ca^{2+} Signalen zu analysieren.

2 Material und Methoden

Die in dieser Arbeit beschriebenen Methoden wurden, soweit nicht anders vermerkt, aus Sambrook & Russell (2001) entnommen oder in Anlehnung daran modifiziert.

2.1 Material

Es wurden Chemikalien in p.a. (*pro analysi*) Qualität der Firmen AppliChem (Darmstadt), GE Healthcare (Freiburg), Biozym (Hess. Oldendorf), Merck (Darmstadt), Eurofins MWG Operon (Ebersberg), PB Bioscience (Rockford, USA), Qiagen (Hilden), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Enzyme und deren Puffer wurden von Ambion (Austin, USA), Life TechnologiesTM (Carlsbad, California), MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), NEB (Schwalbach) und Roche Applied Science (Mannheim) geliefert. Für die Erhaltung und Vermehrung von Bakterienkulturen wurden Medien der Firma Roth (Karlsruhe) verwendet. Für die Zellkultur wurden Medien und Antibiotika von GIBCO (Life TechnologiesTM, Darmstadt) verwendet. Alle Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt und, soweit erforderlich, durch Autoklavieren (20 min, 121 °C) sterilisiert.

2.2 *Escherichia coli* (*E. coli*)-Zellkultur

2.2.1 Bakterienstämme und Plasmidvektoren

In dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

TOP10F'

(Life TechnologiesTM, genotype: F' {*laqI*, TN10(Tet^R)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG*)

BL21 (DE3) LysS

(Stratagene, genotype: F⁻, *ompT*, *hsdS_B* (r_B⁻m_B⁻), *gal*, *dcm* λ (DE3) pLysS (Cam^R)

In dieser Arbeit wurden folgende Plasmidvektoren benutzt:

pcDNATM3.1/Zeo⁽⁺⁾ (Life TechnologiesTM)

Dieses Plasmid wurde für die heterologe Expression von Genen in Zellen der menschlichen, embryonalen Nierenzelllinie 293 (HEK293-Zellen) verwendet.

pcDNATM6/myc-His A (Life TechnologiesTM)

Dieses Plasmid wurde für die heterologe Expression von Genen in HEK293-Zellen verwendet.

pCMV-GCaMP3.0 (Tian et al., 2009)

Dieses Plasmid wurde für die Expression von GCaMP3.0 in HEK293-Zellen verwendet und diente als Grundlage für die Modifikation von GCaMP3.0. Das Plasmid wurde mir freundlicherweise von Dr. L. Looger (Howard Hughes Medical Institute (HHMI), Janelia Farm Research Campus (JFRC), Ashburn, Virginia, USA) zur Verfügung gestellt.

pRSETa-GCaMP3.0 (Tian et al., 2009)

Dieses Plasmid wurde für die heterologe Expression von GCaMP3.0 in *E.coli*- Zellen verwendet. Das Plasmid wurde mir freundlicherweise von Dr. L. Looger (HHMI, JFRC, Ashburn, Virginia, USA) zur Verfügung gestellt.

pRSET A (Life TechnologiesTM)

Dieses Plasmid wurde für die Expression von Genen in *E.coli*- Zellen verwendet.

pXX6-80 (Xiao et al., 1998), **pRC** (Girod et al., 1999)

Diese Plasmide wurden für die Herstellung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren verwendet. Sie wurden mir freundlicherweise von PD Dr. Hildegard Büning (ZMMK, Köln) zur Verfügung gestellt.

pXR1, 4, 5, 6, 8 & 9 (*National Gene Vector Biorepository* (NGVB), Indianapolis, India, USA)

Diese Plasmide wurden für die Herstellung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren verwendet.

pTagRFP-Golgi (Evrogen)

Dieses Plasmid wurde zur Expression eines Golgi-Apparat-Markerproteins verwendet.

pscCMV

Dieses Plasmid wurde für die Herstellung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren sowie zur transienten Expression von Proteinen in HEK293-Zellen verwendet.

2.2.2 Zusammensetzung und Herstellung des Kulturmediums für *E. coli*

LB (Luria-Bertani)-Medium: 1 % (w/v) Baktotrypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt,
1 % (w/v) NaCl

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Alle Flüssigmedien wurden autoklaviert (20 min, 121 °C) und bei RT gelagert. Medien mit Agar wurden autoklaviert und in sterile Petrischalen gegossen (25 - 30 ml/9 cm Petrischale). Die Platten wurden bei 4 °C gelagert. Zur Selektion auf plasmidkodierte Antibiotikaresistenz wurde dem LB-Medium das passende Antibiotikum (Endkonzentration 100 µg/ml) zugesetzt.

2.2.3 Anzucht von *E. coli* Bakterienkulturen

E. coli Zellen einer Bakterienkolonie wurden mindestens 8 h in LB-Flüssigmedium (2.2.2) in einem Rotationsinkubator (New Brunswick, Nürtingen) bei 37 °C angezogen. Zur Selektion auf Plasmide wurde das Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt.

2.2.4 Herstellung kompetenter Zellen zur Transformation von Plasmid-DNA

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der CaCl₂-Methode nach Mandel & Higa (1970). 50 ml LB-Medium wurde mit einer *E. coli* Übernachtskultur (ÜK, 2.2.3) angeimpft, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bei 37 °C inkubiert und anschließend 10 min auf Eis abgekühlt. In den folgenden Schritten wurden ausschließlich vorgekühlte Lösungen und Gefäße verwendet und die Zellen stets auf Eis gehalten. Die Zellen wurden zentrifugiert (Sigma 3K12, 5.000g, 4 °C, 10 min), der Niederschlag vorsichtig in 1 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert, auf 25 ml mit 0,1 M CaCl₂ aufgefüllt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml kaltem 0,1 M CaCl₂/ 25 %

Glycerin resuspendiert und mit derselben Lösung auf 5 ml aufgefüllt. Nach 2 bis 4 h auf Eis wurden die Zellen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.3 Präparation von Plasmid-DNA

DNA-Präparationen wurden in TE-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 7,4) aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

2.3.1 Minipräparation

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus 1,5 – 3,0 ml Kulturvolumen wurde das „Fast Plasmid Kit“ oder das „Perfect Prep Kit“ (5-Prime, Hamburg) nach Herstellerangaben verwendet. Die DNA wurde mit 50 µl TE-Puffer (0,1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 8,5) eluiert.

2.3.2 Maxipräparation

Größere Mengen DNA wurden gemäß den Herstellerangaben mit dem „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) präpariert. Die DNA wurde in einem Volumen von 200-500 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.4 Auftrennung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren für analytische und präparative Zwecke der Größe nach getrennt werden. Je nach Fragmentgröße wurden 0,75 - 2 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Als Puffersystem für die Auftrennung in Agarosegelen diente 1 x TBE. Die Ethidiumbromidkonzentration betrug sowohl im Gel als auch im Laufpuffer 1 µg/ml. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit 1/4 Volumen Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde mit 1 x TBE als Laufpuffer bei 90 V durchgeführt. Die DNA-Fragmente konnten unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

<u>10 x TBE:</u>	1 M Tris Base, 1 M Borsäure, 0,02 M EDTA
<u>Probenpuffer (5 x):</u>	100 mM EDTA, 20 % (w/v) Ficoll 400, 0,01 % (w/v) Xylencyanol, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

2.4.1 DNA-Größen- und Mengenstandard

Als DNA-Größenstandard für Agarosegele (2.4) diente *EcoRI/HindIII* geschnittene λ (cl857 Sam 7)-DNA (MBI Fermentas). Es wurden jeweils 10 μl (0,5 μg) λ -DNA in einer Probenflasche des Agarosegels aufgetragen. Tab. 2-1 zeigt die Fragmentgrößen und DNA-Mengen bei 0,5 μg eingesetzter λ -DNA.

Tab. 2-1: Fragmentgrößen und DNA-Mengen bei 0,5 μg eingesetzter λ (cl857 Sam 7)-DNA.

Länge [bp]	Menge [ng]
21.226	218,8
5.148	53,1
4.973	51,3
4.268	44,0
3.530	36,4
2.027	20,9
1.904	19,6
1.584	16,3
1.375	14,2
947	9,8
831	8,6
564	5,8

2.4.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren mit Hilfe von Agarosegelen

Die auf ein Agarosegel (2.4) aufgetragene DNA-Menge konnte nach der Gelelektrophorese durch Vergleich mit einem aufgetragenen Größen- und Mengenstandard (Tab. 2-1) anhand der Fluoreszenzintensitäten der Banden unter UV-Licht (302 nm) abgeschätzt werden.

2.4.3 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption der Lösung bei 260 nm gemessen. Eine Absorption von 1,0 entspricht 50 μg DNA/ml. Eine Aussage über Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenolresten konnte durch die zusätzliche Bestimmung

der Absorption bei 280 nm getroffen werden. Bei reinen DNA-Präparationen sollte der Wert des Quotienten $A_{260/280}$ zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.4.4 Isolierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen mit Hilfe des „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche, Mannheim, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben isoliert. Zur Isolierung von PCR Produkten wurden diese ohne elektrophoretische Auftrennung mit dem Kit aufgearbeitet. Die geschnittene DNA wurde mit EDTA-freiem Tris/HCl-Puffer (pH 8,5) eluiert.

2.5 Manipulation von Nukleinsäuren

2.5.1 Restriktion von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA wurde mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen in 1 x Inkubationspuffer (des Herstellers) bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur geschnitten. Inkubationen mit mehreren Enzymen wurden bei übereinstimmenden Pufferbedingungen gleichzeitig durchgeführt. Die Menge an Enzymeinheiten, die ein quantitatives Schneiden der DNA ermöglichten, wurde für jeden Ansatz berechnet. Enzyme wurden in einer 50 %igen (v/v) Glycerinlösung bei -20 °C gelagert. Das Volumen eingesetzter Nukleasen sollte 1/10 des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da eine höhere Glycerinkonzentration die Aktivität und Spezifität der Enzyme verringert. Restriktionsanalysen wurden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt und, wenn nicht anders vermerkt, nach 1 h Inkubation auf ein Agarosegel aufgetragen (2.4). Das Volumen für präparative Ansätze betrug 30-50 µl. Diese wurden vollständig auf das Agarosegel aufgetragen (2.4) und das gewünschte Fragment eluiert (2.4.4).

2.5.2 Dephosphorylierung von Plasmid Vektoren

Vektoren mit glatten oder komplementären Enden wurden mit dem „Rapid Dephospho & Ligation Kit“ (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben dephosphoryliert, um eine Religation zu verhindern. Ein Dephosphorylierungsansatz enthielt, wenn nicht anders vermerkt, 1 µg DNA.

2.5.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Für Ligationen wurde das „Rapid Dephospho & Ligation Kit“ (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben verwendet. Pro Ligationsansatz wurden jeweils 50-200 ng DNA eingesetzt, wobei ein 3-fach molarer Überschuss des DNA-Fragments gegenüber dem geschnittenen Vektor eingehalten wurde.

2.5.4 Transformation

Zu 100 µl kompetenten Zellen (2.2.4) wurde jeweils 1/10 eines Liagtionsansatzes (2.5.3) gegeben, vorsichtig gemischt und mindestens 20 min auf Eis inkubiert.

Eine „Retransformation“ wurde durchgeführt, um Plasmid-DNA nochmals vermehren zu können. Dazu wurden 0,5 µl Plasmid-DNA mit 100 µl kompetenten Zellen (2.2.4) versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. In beiden Fällen wurden die Zellen im Anschluss auf LB-Agarplatten (2.2.2) mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht (üN) bei 37 °C inkubiert.

2.5.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können DNA Fragmente spezifischer Länge und Sequenz amplifiziert werden. In mehreren Zyklen wird die Template-DNA hitzedenaturiert, mit geeigneten Oligonukleotiden (Primern, 2.5.5.2) hybridisiert und diese mit einer hitzestabilen Polymerase verlängert (Mullis et al., 1986). Das PCR-Fragment wird anschließend enzymatisch restringiert (2.5.1) oder geglättet (2.5.5.3), bevor es in einen geeigneten Vektor kloniert (2.5.3) wird.

2.5.5.1 Bedingungen der PCR-Reaktionen

Die Reaktionen wurden in einem „TRIO-Thermoblock“ (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Vor dem ersten Zyklus wurde die DNA 2 min bei 94 °C denaturiert. Während der Zyklen wurde für je 30 s denaturiert und 30 s hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur entsprach der niedrigeren Schmelztemperatur (T_m) der beiden Primer. Sie wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$T_m = (G + C) \cdot 4\text{ °C} + (A + T) \cdot 2\text{ °C} - \text{Basenfehlpaarung} \cdot 4\text{ °C} - 4\text{ °C}$$

Zur Strangverlängerung wurde bei 72 °C für je 45 s inkubiert. Es wurden 30-35 Zyklen durchgeführt. Es wurde die KOD Hot Start DNA-Polymerase (Merck) verwendet und die PCR laut Herstellerangaben angesetzt. Das entstandene PCR Produkt wurde, wie in 2.4.4 beschrieben, aufgereinigt.

2.5.5.2 Verwendete Oligonukleotide (Primer)

Oligonukleotide wurden bei der Firma Eurofins MWG/Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und mit einer Konzentration von 1 µg/µl in TE gelöst. Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang (s. Anhang, Tab. 6-1 - Tab. 6-3).

2.5.5.3 Auffüllen überhängender Einzelstrang-Enden

Zum Auffüllen überhängender Enden der PCR-Fragmente wurden 2 U T4-DNA-Polymerase/µg DNA (NEB) in einem beliebigen Restriktionspuffer und 100 µmol dNTPs eingesetzt. Überhängende 5'-Enden wurden durch die 5'→3'-Polymeraseaktivität des Enzyms aufgefüllt, die überhängenden 3'-Enden durch die 3'→5'-Exonukleaseaktivität des Enzyms entfernt. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend für 20 min bei 75 °C inaktiviert.

2.5.5.4 Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA Fragmenten

Geglättete PCR-Fragmente (2.5.5.3) haben keine endständigen 5'-Phosphatgruppen. Daher wurden die 5'-Enden der Fragmente vor der Ligation phosphoryliert. Die DNA wurde mit 5-10 U T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK; Roche) in dem mitgelieferten Puffer und 0,5 µl ATP (1 mM) für 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion des Enzyms bei 65 °C für 10 min gestoppt. Das Fragment wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel eluiert (2.4.4) und in einen entsprechenden Vektor ligiert (2.5.3).

2.5.6 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG/ Operon (Ebersberg) durchgeführt. Dazu wurde die DNA in 15 µl TE-Puffer verdünnt (50 – 100 ng/µl).

2.5.7 Semi-quantitative PCR (sqPCR)

Mit der semiquantitativen PCR (sqPCR) wurden die Transkripte eines Gens in Zellproben nachgewiesen. Zunächst wurde die mRNA (2.5.7.1) präpariert und in cDNA (2.5.7.2) umgeschrieben. Ein kurzer Abschnitt des untersuchten Gens wurde amplifiziert (2.5.5). Die entstandenen Genfragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese (2.4) analysiert. Als Referenzgen diente β -Aktin. Für jedes zu untersuchende Gen wurden spezifische Primer ausgewählt (s. Anhang, Tab. 6-2).

2.5.7.1 Präparation von RNA

Die RNA wurde entsprechend Herstellerangaben mit dem AllPrep RNA/Protein Kit (Qiagen, Hilden) aus HEK293-Zellen präpariert. Die RNA wurde entweder ethanolgefällt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder direkt in cDNA umgeschrieben (2.5.7.2).

2.5.7.2 Reverse Transkription

Die RNA wurde mit oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primern (Life TechnologiesTM) und Reverser Transkriptase (M-MLV-RT, Life TechnologiesTM) in Einzelstrang cDNA umgeschrieben. Dazu wurde sie mit $0,8\text{ }\mu\text{g}$ oligo(dT)₁₂₋₁₈ gemischt und für 10 min bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Hybridisierung der Primer an die mRNA erfolgte dann für 2 min auf Eis. Die cDNA Synthese fand in einem Endvolumen von $50\text{ }\mu\text{l}$ mit 1 mM dNTPs, 40 U RNaseOUTTM (Life TechnologiesTM), $1\times$ First-Strand Buffer, 10 mM DTT, 400 U M-MLV-RT für 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ statt. Die M-MLV-RT wurde für 10 min bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ inaktiviert.

5 x First-Strand Buffer: 250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂

2.6 Präparation, Trennung und Nachweis von Proteinen

2.6.1 Überexpression von rekombinanten Proteinen

Die Überexpression von rekombinanten Proteinen wurde im *E. coli* Stamm BL21 (DE3) LysS in Chloramphenicol-haltigem ($50\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$) Medien durchgeführt. Als Expressionssystem wurde der Vektor pRSETa (Life TechnologiesTM) verwendet. Durch die Klonierung des Zielgens in diesen Vektor wurden dem Fusionsprotein am N-Terminus sechs Histidine hinzugefügt (*hexa-*

histidine tag, 6x His-Tag). Dieser Tag ermöglicht die Aufreinigung des Fusionsproteins über Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (*Nickel-nitrilotriacetic acid*, Ni-NTA).

Zur Expression der rekombinanten Proteine wurden 500 ml LB-Medium mit Chloramphenicol (50 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml) versetzt und anschließend mit einer über Nacht gezogenen *E. coli*-Kultur angeimpft (1:100). Die Bakterien wurden bei 37 °C in einem Schüttler (180 rpm, Infors, Einsbach) bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,4 - 0,6$) vermehrt. Die Proteinexpression wurde dann durch Zugabe von 0,5 M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Temperatur wurde nach der Induktion auf 20 °C herabgesetzt. Die Zellen wurden $\sim 18-21$ h nach der Induktion geerntet. Dazu wurden die Zellen bei 4 °C und 5500 rpm pelletiert (10 min, Beckmann 2-21, SLA 3000 Rotor).

2.6.2 Reinigung von 6x His-Fusionsproteinen

Alle Puffer und Lösungen, die für die Reinigung von 6 x His-Fusionsproteinen verwendet wurden, enthielten den Proteaseinhibitor mpic (1:500). Das *E. coli*-Zellpellet (2.6.1) wurde in 10 ml Äquilibrierpuffer (Puffer A) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Puffer A resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde mit 1 mg/ml Lysozym sowie mit einigen Kristallen DNase versetzt und dann für 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde sonifiziert (3x 30 s, Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company) und dann zentrifugiert (5500 rpm, 4 °C, ~ 60 min; 3-16K, Sigma). Der Überstand enthielt das rekombinante Protein. Beginnend mit diesem Rohextrakt wurde von jedem Reinigungsschritt ein Aliquot genommen. Diese Aliquots wurden mittels SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, 2.6.4) analysiert.

Zur Isolierung des Fusionsproteins wurde Ni-NTA Agarose verwendet (Macherey und Nagel, Düren). Die Histidine, die dem N-Terminus des Fusionsproteins angefügt wurden (2.6.1), können stabile Chelat-Komplexe mit den an der Matrix immobilisierten Ni^{2+} -Ionen bilden. Dadurch wird das Zielprotein durch die Ni-NTA Agarose zurückgehalten. Das Fusionsprotein wurde im *Batch*-Verfahren an die Matrix gebunden: 1 ml Ni-NTA Agarose wurde in einem 50 ml Reaktionsgefäß zwei Mal mit jeweils 10 Säulenvolumen (SV) Puffer A äquilibriert. Die Matrix wurde durch Zentrifugation pelletiert (700 x g, 4 °C, 5 min; 3-16K, Sigma). Anschließend wurde das Zelllysate zu der Agarose gegeben, vorsichtig gemischt und schließlich für 30 min bei RT geschwenkt (Shaker 3012, GFL). Nachdem der Überstand von der Matrix getrennt wurde (700 x g, 4 °C, 5 min; 3-16K, Sigma), wurde das an die Ni-NTA

Agarose gebundene Protein zwei Mal mit jeweils 20 SV Waschpuffer (Puffer B) gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde die Matrix in 5 ml Puffer B resuspendiert und in eine Einmalsäule (Poly-Prep® Chromatography Columns, Biorad, München) überführt. In dieser Säule wurde die Matrix abschließend noch einmal mit 5 SV Puffer B gewaschen. Das rekombinante Protein wurde schließlich mit Elutionspuffer (150 mM Imidazol) in 500 µl Schritten eluiert. Die Affinität der Ni²⁺-Ionen für das Imidazol ist höher als für die Histidine, sodass das Zielprotein von einem Überschuss an Imidazol verdrängt werden kann.

<u>1 x Puffer A:</u>	50 mM Na ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol
<u>1 x Puffer B:</u>	50 mM Na ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol
<u>1x Elutionspuffer:</u>	50 mM Na ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol

2.6.3 Quantifizierung von Proteinen mit der Bradford- Methode

Um die Gesamtproteinkonzentration (s. z.B. 2.6.2) zu bestimmen, wurde das „protein assay“ Reagenz von Biorad (München) verwendet. Dieses Reagenz enthält den Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue G-250*, der an Proteine bindet. In dem sauren Milieu des Reagenz ändert sich das Absorptionsmaximum des proteingebundenen Farbstoffes von 495 nm auf 595 nm. Die Proben wurden 1:10 in H₂O verdünnt. 10 µl oder 20 µl der Verdünnung wurden auf 800 µl mit H₂O aufgefüllt. Anschließend wurden 200 µl Bradford-Reagenz hinzugegeben. Nach 5 min Inkubation im Dunklen wurde die Extinktion der Probe bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration der Probe wurde bestimmt, indem die Extinktion der Probe bei 595 nm mit einer Kalibrierreihe verglichen wurde, die aus den Messwerten definierter BSA Konzentrationen (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 µg) erstellt wurde. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E = Extinktion bei 595 nm

ε = molarer Extinktionskoeffizient (1 mol⁻¹ · cm⁻¹)

c = Konzentration (mol/l)

d = Schichtdicke der Küvette (cm)

2.6.4 Trennung von Proteinen durch Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung der Proteine wurde nach Laemmli (1970) durchgeführt. Es wurden diskontinuierliche Gele mit 12,5 %igen Trenngelen hergestellt (Tab. 2-2).

Tab. 2-2: Zusammensetzung der SDS-Proteingele

Lösung	Sammelgel	Trenngel 12,5 %
0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)	0,5 ml	1,5 ml
10 % (w/v) SDS	20 µl	60 µl
30 % (w/v) Acrylamid	0,34 ml	2,5 ml
H ₂ O	1,12 ml	1,92 ml
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	20 µl	20 µl
TEMED	1 µl	1 µl

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) wurde in einer „Minigel Twin“-Kammer (Biometra, Göttingen) (Gelmaße: 0,1 x 8 x 10 cm) durchgeführt. Die Proben wurden mit 1/3 Volumen SDS-Probenpuffer versetzt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte mit Elektrodenpuffer im Biometra-System bei 15 mA im Sammelgel und 20 mA im Trenngel. Als Größenstandards bei der SDS-PAGE dienten die Proteine des „Mark 12TM Unstained Standard“ (Life TechnologiesTM).

4 x SDS Probenpuffer:

1,6 % (w/v) SDS, 50 mM Tris/HCl (pH 7,6),

12,5 % (v/v) Glycerin,

1 % (v/v) β-Mercaptoethanol,

0,00013 % (w/v) Bromphenolblau

10 x SDS-Elektrodenpuffer:

250 mM Tris/HCl, 1 % (w/v) SDS, 1,92 M Glycin

Mark 12™ Unstained Standard

200 kDa	Myosin
116,3 kDa	β-Glactosidase
97,4 kDa	Phosphorylase b
66,3 kDa	BSA
55,4 kDa	Glutamatdehydrogenase
36,5 kDa	Lactatdehydrogenase
31 kDa	Carboanhydrase
21,5 kDa	Trypsin Inhibitor
14,4 kDa	Lysozym
6 kDa	Aprotinin
3,5 kDa	Insulin B-Kette
2,5 kDa	Insulin A-Kette

2.6.5 Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie Blau

Das Färben von SDS-Polyacrylamidgelen (2.6.4) wurde in Anlehnung an Meyer & Lamberts (1965) durchgeführt. Es wurde der Farbstoff „Coomassie Brilliant Blue R250“ (Serva) verwendet. Die Gele wurden für 0,5-2 h oder üN in Färbelösung gelegt. Anschließend wurden die Gele bis zum Erreichen des gewünschten Färbegrades in Entfärbelösung inkubiert.

<u>Färbelösung:</u>	0,2 % (w/v) SERVA Blue R, 30 % (v/v) Ethanol (vergällt), 10 % (v/v) Essigsäure
<u>Entfärbelösung:</u>	30 % (v/v) Ethanol (vergällt), 10 % (v/v) Essigsäure

2.7 HEK293-Zellkultur

2.7.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

2.7.1.1 Sterilarbeit

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer Umluft-Werkbank (Heraeus, Hanau) durchgeführt. Alle die Zellkultur betreffenden Substanzen wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Life TechnologiesTM bezogen.

2.7.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Sie wurde mit einer Zählprobe, das heißt einer 1:10 Verdünnung der Zellsuspension in Phosphat-gepufferter Saline (*phosphate buffered saline*, PBS), befüllt. Die Zellzahl wurde lichtmikroskopisch bestimmt. Hierzu wurden die Zellen gezählt, die sich in 8 Feldern mit je 16 Quadraten befanden und der Mittelwert gebildet. Die Zellzahl wurde nach folgender Gleichung ermittelt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \text{Zellzahl Mittelwert} \cdot 10^5$$

Phosphat-gepufferte Saline (PBS): 137 mM NaCl, 2,6 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄,
pH7,4

2.7.1.3 Kultivierung der Zellen

Die HEK293-Zellen wurden in M10-Medium (*Minimal Essential Medium* (MEM + Glutamax I) mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum, 1 % (v/v) Antibiotika/Antimykotika und 1 % (v/v) nicht essentiellen Aminosäuren) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit in 10 cm Petrischalen kultiviert. Die Generationszeit der HEK293-Zellen beträgt ca. 24 h. Das Medium wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Bei einer Dichte von ca. 10⁷ Zellen/Petrischale wurden die Zellen abgelöst und auf neue Petrischalen verteilt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 10 ml PBS gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin/EDTA (0,05 %/ 0,53 mM in Hanks'-Lösung, Life TechnologiesTM) bei 37 °C abgelöst. Um das Trypsin zu inhibieren und zu entfernen, wurden die Zellen in 5 ml M10-Medium

resuspendiert und anschließend zentrifugiert (Sigma 3K12, 200g, 5 min). Das Zellpellet wurde erneut in 5 ml M10 Medium resuspendiert. Ein Teil der Zellen wurde für die Zellerhaltung mit 8 ml frischem M10-Medium in 10 cm Petrischalen ausgesät.

Um Zellen in Multiwellplatten (MWP) mit oder ohne Glasplättchen auszusäen, mussten diese zuvor mit Poly-L-Lysin (PLL, 0,1 mg/ml, Sigma-Aldrich) für mindestens 2 h beschichtet werden. Nach der Inkubationszeit wurden sie zwei Mal mit PBS gewaschen und mit M10-Medium gefüllt. Anschließend wurden definierte Volumen mZellzahlen von 10.000 - 100.000 Zellen ausgesät. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.7.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen von einer 10 cm Petrischale, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, Konfluenz ca. 60 - 70 %, wurden auf zwei Kryoröhrchen verteilt und eingefroren. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA vom Schalenboden abgelöst. Die Zellen wurden in M10-Medium resuspendiert und anschließend zentrifugiert (Sigma 3K12, 200g, 5 min). Das Zellpellet wurde in 1,9 ml M10-Medium resuspendiert. Pro Kryoröhrchen wurde 0,1 ml steriles Dimethylsulfoxid (DMSO) vorgelegt und jeweils 0,9 ml Zellsuspension hinzugegeben. Die Zellen wurden zunächst über flüssigem Stickstoff eingefroren und zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen im Kryoröhrchen kurz in einem 37 °C Wasserbad geschwenkt. Um Reste von DMSO zu entfernen wurden die Zellen in 10 ml M10 Medium verdünnt und zentrifugiert (Sigma 3K12, 200g, 5 min). Das Zellpellet wurde in frischem M10 Medium resuspendiert und auf zwei 10 cm Petrischalen mit M10-Medium aufgeteilt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. Bei Bedarf wurde Blastocidin (10 µg/ml) oder Zeocin (100 µg/µl) hinzugefügt.

2.7.1.5 Transiente, heterologe Expression von Proteinen in HEK 293-Zellen

Die Transfektion wurde nach der Calciumphosphat-Methode (CaPO₄-Methode; Chen and Okayama, 1987) durchgeführt. Es wurden 4×10^5 Zellen auf 5 cm Petrischalen transfiziert. Ein Transfektionsansatz ist in Tab. 2-3 dargestellt. Der Transfektionsansatz wurde für 20 min bei RT inkubiert und anschließend in die Kulturschale mit HEK293 Zellen pipettiert. Die DNA wurde durch eine 20-22 h Inkubation bei 35 °C, 3 % CO₂ und ~95 % Luftfeuchtigkeit präzipitiert.

Tab. 2-3: Transfektionsansatz für eine 5 cm Petrischale

Lösung	Volumen
Expressionsplasmid (8-12 µg)	x µl
H ₂ O	124 µl – x µl
CaCl ₂ (1 M)	41 µl
2 x BBS (pH 6,95) ¹⁾	165 µl

¹⁾ 2 x BBS (pH 6,95) = 50 mM N,N-bis-(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure (BES); 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄

Die transfizierten Zellen wurden mit 3 ml PBS und zur Entfernung des CaPO₄-DNA-Präzipitats mit 2 ml PBS/EDTA (0,5 %, pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 300 µl Trypsin/EDTA (Life TechnologiesTM) bei 37 °C inkubiert, bis sie sich ablösten. Die Zellen wurden in 4,7 ml M10-Medium resuspendiert und in MWP mit PLL-beschichteten Deckgläsern pipettiert (262.7.1.3). Die Zellen wurden 20-22 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und ~95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Zellen konnten für die konfokale Mikroskopie von Fluoreszenzproteinen, die immunzytochemische Analyse von heterolog exprimierten Proteinen und Ca²⁺ Imaging Experimente verwendet werden.

2.7.1.6 Stabile Transfektion von HEK293-Zellen

Zellen wurden wie in 2.7.1.5 beschrieben transfiziert und abgelöst. Die resuspendierten Zellen wurden auf 9 cm Petrischalen verteilt (50-200 µl Zellsuspension pro Schale). Transfizierte Zellklone wurden durch Zugabe eines geeigneten Antibiotikums selektioniert. 24 h nach der Transfektion wurde das M10-Medium gegen antibiotikumhaltiges M10-Medium ausgetauscht und alle 2-3 Tage durch frisches antibiotikumhaltiges M10-Medium ausgetauscht. Welches Antibiotikum verwendet wurde, hing von dem Plasmid ab, in dem das Transgen codiert wurde. Bei Transfektionen mit pcDNA3.1(+)-Zeo wurde Zeocin (100 µg/ml) verwendet, bei Transfektionen mit pcDNA6mycHisA Blasticidin (10 µg/µl). Wurden HEK293-Zellen mit beiden Plasmiden transfiziert wurden beide Antibiotika dem Medium hinzugefügt.

Nach 10-21 Tagen konnten resistente Klone identifiziert werden. Einzelne Zellkolonien wurden in die Vertiefungen einer 24er MWP überführt, in die 0,5 ml M10-Antibiotikum Medium vorgelegt worden war. Die Expressionsstärke und -homogenität einzelner Zellklone

wurde immunologisch (2.8) oder durch Imaging- Methoden (2.12) untersucht. Klone, die das Protein homogen exprimierten, wurden vermehrt (2.7.1.3) und eingefroren (2.7.1.4). Bei mangelnder Homogenität wurden die Zellklone nochmals vereinzelt (2.7.1.7).

2.7.1.7 Vereinzlung von Zellklonen

Zellen in den Vertiefungen einer 24er MWP wurden mit 500 µl PBS pro Vertiefung gewaschen, mit 100 µl Trypsin/EDTA bei 37 °C für einige min inkubiert und in 1 ml M10-Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und je eine Zelle in die Vertiefung einer 96er MWP ausgesät. Die restlichen Zellen wurden zur Erhaltung auf 5 cm Schalen mit 3 ml frischem M10-Medium mit Selektionsantibiotikum ausgesät. Nach ca. zwei Wochen wurden einzelne Zellkolonien der 96er MWP mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA bei 37 °C abgelöst. Die Zellsuspensionen wurden hälftig in die Vertiefungen von zwei 24er MWP ausgesät. Anschließend wurden Zellen einer MWP mit immunzytochemischen Färbungen (2.8) auf die Expression des Zielproteins hin untersucht. Klone, die das Protein exprimierten, wurden vermehrt (2.7.1.3) und eingefroren (2.7.1.4).

2.7.2 Herstellung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren (rAAV)

Zur Herstellung von rAAV wurden pro Konstrukt mindestens fünf 14,5 cm Zellkultur-Petrischalen eingesetzt. 24 h vor der Transfektion wurden pro Petrischale 7×10^6 HEK293-Zellen in DH10-Medium (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum, 1 % (v/v) Antibiotika/Antimykotika) ausgesät.

2.7.2.1 Transfektion

Zellen wurden nach der CaPO₄-Methode (Chen and Okayama, 1987) transfiziert. Ein exemplarischer Transfektionsansatz ist in Tab. 2-4 dargestellt. Zur Vorbereitung des Transfektionsansatzes wurden pro Petrischale 7,5 µg des Zielgen codierenden Plasmids, 22,5 µg Adeno-Helferplasmid pXX6-80 (Xiao et al., 1998) und je nach Serotyp 7,5 µg des Helferplasmids pRC (Girod et al., 1999) bzw. pXR (NGVB, Indianapolis, India, USA) in 1 ml CaCl₂-Lösung verdünnt. Es wurde 1 ml Transfektionspuffer HBS zugetropft, gevortext und 2 min bei RT inkubiert. Die Transfektionslösung wurde anschließend in die Schale pipettiert. Die Zellen wurden 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das

Medium wurde durch DH10-Medium mit 2 % fötalem Kälberserum ersetzt und die Zellen für weitere 24 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Tab. 2-4: Transfektionsansatz für eine 14,5 cm Petrischale

Lösung	Menge
CaCl ₂ (250 mM)	1 ml
Zielgen codierendes Plasmid	7,5 µg
pXX	22,5 µg
pRC oder pXR	7,5 µg
2 x HBS (pH 6,95) ¹⁾	1 ml

¹⁾ HBS (2x) (pH 7,12) = 50 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄

2.7.2.2 Ernte und Aufschluss der Zellen

Das Medium wurde abgenommen und durch 10 ml PBS M/K ersetzt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Schalenboden abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen (50 ml, BD Biosciences) überführt. Die Zellen wurden pelletiert (Sigma 3K12, 300g, 4 °C, 10 min), in 2,5 ml Aufschlusspuffer aufgenommen und dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Wurden mehrere 14,5 cm Schalen mit HEK293 Zellen mit demselben Konstrukt transfiziert (2.7.2), wurden die Zellen in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt. Das Volumen an eingesetztem Lysispuffer wurde dementsprechend angepasst.

Zur Entfernung freigesetzter DNA wurde die Suspension mit Benzonase (50 U/ml) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellrückstände wurden anschließend durch Zentrifugation (Sigma 3K12, 3.700g, 4 °C, 10 min) pelletiert. Der AAV-haltige Überstand wurde durch eine Dichtegradientenzentrifugation (2.7.2.1) aufgereinigt.

<u>PBS M/K:</u> 137 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 2,6 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
<u>Lysispuffer:</u> 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8,5

2.7.2.3 Aufreinigung von rAAV durch Dichtegradientenzentrifugation

Durch eine Dichtegradientenzentrifugation mit Iodixanol (Sigma-Aldrich) wurden die rAAV angereichert. Die Suspension aus 2.7.2.2 wurde in ein Ultrazentrifugationsröhrchen (Polycarbonat, 25 x 89 mm, 26,3 ml, Beckmann Coulter, Krefeld) überführt und je nach Ausgangsvolumen mit 4 Teilen 15 %iger, 3,5 Teilen ml 25 %iger, 5 ml 40 %iger und 2,5 Teilen 60 %iger Iodixanol- Lösung unterschichtet (Tab. 2-5).

Nach der Ultrazentrifugation (Beckmann Coulter 70 Ti, 60.000g, 4 °C, 2 h) wurde die 40 %ige Phase mit einer 0,9 x 70 mm Sterican Kanüle (Braun, Melsungen) abgenommen. 10 µl dieser Suspension wurden zu späteren Titerbestimmung aufbewahrt. Die rAAV wurden bei -80 °C gelagert und vor ihrer Verwendung auf Eis aufgetaut.

Tab. 2-5: Iodixanol Gradienten-Lösungen

Iodixanol-Lösung	15 %¹⁾	25 %	40 %	60 %
10 x PBS	10 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)	10 % (v/v)
MgCl ₂	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
KCl	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
NaCl	1 M			
Iodixanol	15 % (v/v)	25 % (v/v)	40 % (v/v)	60 % (v/v)
Phenolrot	7,5 x 10 ⁻⁴ % (v/v)	1,0 x 10 ⁻³ % (v/v)		2,5 x 10 ⁻⁴ % (v/v)

¹⁾ Die prozentualen und molaren Angaben beziehen sich auf die Endkonzentration der Substanz oder Lösung.

2.7.2.4 Titerbestimmung von rAAV

Die Aliquots aus 2.7.2.3 wurden mit 190 µl PBS aufgefüllt. Das Virusgenom wurde mit dem DNeasy Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben präpariert, wobei die DNA mit 10 mM Tris/HCl (pH 8,5) eluiert wurde.

Die DNA-Menge wurde mit einer quantitativen Real Time PCR (qRT-PCR, 2.7.2.4.1) über den Nachweis eines kurzen Abschnitts der Sequenz des CMV-Promotors bestimmt. Die Amplifikationsprodukte wurden anhand definierter Referenzproben (Standards) quantifiziert. Die Herstellung der Standards erfolgte durch PCR auf pbluescript SK⁻-CMV-Promotor Subklonen. Die eingesetzten Primer hatten eine Schmelztemperatur von 62 °C und einen G/C Gehalt von mindestens 50 % (s. Anhang, Tab. 6-3).

Es wurden größere Mengen des CMV Standardfragments amplifiziert und mit dem PCR Purification Kit (Roche) nach Herstellerangaben gereinigt (2.4.4). Die Konzentration des Fragments wurde photometrisch (2.4.3) bestimmt. Anhand nachfolgender Gleichung wurde die Molekülzahl des Standardfragments ermittelt:

$$\text{Fragmentzahl} = \frac{6,23 \cdot 10^{23} [\text{mol}^{-1}] \cdot m [\text{g}]}{\text{Fragmentlänge} \cdot 660 [\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}]}$$

Es wurde eine Verdünnungsreihe des CMV-Promotor-Fragments hergestellt (10^9 - 10^3 Moleküle) und für die qRT-PCR eingesetzt. Anhand der *crossing points* der Standardfragmente wurde eine Kalibriergerade zur Quantifizierung der Proben erstellt (2.7.2.4.2).

2.7.2.4.1 Real Time PCR

Die Real Time PCR wurde im LightCycler 1.5 (Roche) durchgeführt. Es wurde das Quantitect SYBR GREEN I Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die PCR-Reaktionen fanden in speziellen Glaskapillaren (LightCycler Capillaries, Roche) statt. Der Farbstoff SYBR Green bindet an doppelsträngige DNA. Dabei entsteht ein Fluoreszenzfarbstoffkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 521 nm. Die am Ende jedes Amplifikationszyklus gemessene Fluoreszenzintensität ist proportional zur Menge der doppelsträngigen DNA. Die Inkubationsschritte der PCR sind in Tab. 2-6 aufgeführt.

Für jedes Primerpaar wurden zwei Negativkontrollen mit Wasser durchgeführt. Drei unterschiedliche Konzentrationen des Standardfragments wurden in Doppelbestimmungen gemessen. Die Menge des Zielgens wurde durch Dreifachbestimmungen ermittelt. Das Pipettierschema für einen Ansatz ist exemplarisch in Tab. 2-7 angegeben.

Zusätzlich zur quantitativen Bestimmung des Zielgens wurde von jedem Reaktionsansatz die Schmelzkurve bestimmt. Anhand der Schmelzkurve (2.7.2.4.3) wurde ersichtlich, ob sich unterschiedliche oder identische PCR-Reaktionsprodukte gebildet hatten. Die Probe wurde kurz auf 95 °C erhitzt. Die PCR-Produkte wurden 15 s bei der Annealingtemperatur von 62 °C hybridisiert und dann mit 0,1 °C/s wieder aufgeschmolzen und die Fluoreszenzintensität kontinuierlich gemessen wurde.

Tab. 2-6: Ablauf der *Real Time PCR*

Programm	Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen	Detektion
Vorinkubation	Denaturierung	95 °C	10 min	1	-
Amplifikation	Denaturierung	95 °C	10 s	50	-
	Annealing	62 °C	15 s		-
	Synthese	75 °C	15 s		einfach
Schmelzkurve	Denaturierung	95 °C	1 s	1	-
	Annealing	62 °C	15 s		-
	Schmelzen	65 → 95 °C	0,1 °C/s		kontinuierlich
Abkühlen		40 °C	30 s	1	-

Tab. 2-7: Ansatz einer qRT-PCR

Lösung		Menge
Mix	SYBER Green Mix	10
	Primer 1 [10 pmol/μl]	1
	Primer 2 [10 pmol/μl]	1
	H ₂ O	6
Probe	Standardfragment	2
	DNeasy Eluat	2
	H ₂ O	2

2.7.2.4.2 Auswertung

Zu Beginn der PCR-Reaktion wird ein geringer Fluoreszenzwert gemessen, die Hintergrundfluoreszenz. Es sind noch keine doppelsträngigen Amplifikationsprodukte vorhanden. Während der folgenden PCR-Zyklen wird das doppelsträngige Amplifikationsprodukt gebildet. Daran bindet SYBR Green und die Fluoreszenzintensität nimmt zu. Die exponentielle Phase der Amplifikation ist entscheidend für die Auswertung, da hier die Produktmenge von der des eingesetzten Fragments abhängig ist. Alle Reaktionen erreichen schließlich eine Plateauphase in der kein weiteres Produkt mehr gebildet wird. Die Fluoreszenzintensität bleibt konstant. Die Änderung der Fluoreszenzintensität kann durch eine sigmoidale Funktion dargestellt werden.

Berechnet man von dieser Funktion das Maximum der zweiten Ableitung, erhält man den crossing point (CP). Am CP befindet sich in allen Reaktionen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Den CP-Werten der Standardfragmente können definierte Fragmentmengen zugeordnet werden. Die Kalibriergerade entspricht also einer Funktion der CP-Werte in Abhängigkeit von der eingesetzten Fragmentmenge. Anhand dieser Geraden kann die DNA-Ausgangsmenge der cDNA-Proben mit Hilfe ihres CP-Werts ermittelt werden. Zusätzlich wird die PCR-Effizienz (E) durch die Steigung der Kalibriergeraden (m) mit der Gleichung

$$E = 10^{-1/m}$$

errechnet. Unter optimalen Bedingungen beträgt die Steigung $m = -3,3$ und damit entspricht die PCR-Effizienz 2, also einer Verdopplung der PCR-Produkte in jedem Zyklus.

2.7.2.4.3 Schmelzkurve der PCR-Fragmente

Jedes PCR-Produkt hat eine spezifische Schmelztemperatur. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green bindet an jede doppelsträngige DNA. Das bedeutet, dass er auch an unspezifische Primerdimere bindet, die eine geringere Schmelztemperatur als die gewünschten Amplifikationsprodukte besitzen. Die Spezifität der PCR-Produkte wird überprüft, indem von jedem Reaktionsansatz eine Schmelzkurve bestimmt wird. Zu Beginn der Analyse liegt die maximale Menge an Fragmenten doppelsträngig vor und die Fluoreszenzintensität ist maximal. Während der langsamen Erwärmung des Ansatzes nimmt die Fluoreszenzintensität ab, da immer mehr Fragmente denaturieren. Sind 95 °C erreicht, sind alle doppelsträngigen Fragmente aufgeschmolzen und die Fluoreszenzintensität erreicht einen Basiswert. Bildet man die Fluoreszenzintensität gegen die Temperatur ab, erhält man die Schmelzkurve der Reaktion. Das Maximum der Ableitung dieser Funktion gibt die Schmelztemperatur an.

2.7.2.5 Infektion von Kulturzellen mit rAAV

HEK293 Zellen (2×10^4) wurden einen Tag vor der Infektion mit rAAV in 24er MWP mit PLL- beschichteten Glasplättchen in M10-Medium ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium durch 200 µl frisches M10 Medium ersetzt, in dem 10^8 rAAV suspendiert waren. Das entspricht einem Verhältnis von 5.000 rAAV pro Zelle. Die Zellen wurden insgesamt

72 h mit den rAAV bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert und anschließend immunzytochemisch analysiert (2.8).

Corticale Primär-Zellkulturen aus der Ratte wurden freundlicherweise vom Dr. Wienke Lange (ICS-8, FZ Jülich) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden acht Tage vor der Infektion mit rAAV präpariert und in 24er MWP auf PLL-beschichteten Glasplättchen mit 1×10^5 Zellen in NB-Medium (Neurobasal[®]-Medium/ 2 % B27/ 0,25 % Glutamin; GIBCO) ausgesät. Am 8. Tag *in vitro* (*Day in vitro*, DIV) wurde das Medium durch 400 µl frisches NB-Medium ersetzt, in dem $10^9 - 10^{10}$ rAAV suspendiert waren. Die Zellen wurden mit den rAAV weitere sechs Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach vier und sieben Tagen wurden jeweils 50 µl frisches NB- Medium hinzugegeben. Am 8. Tag nach der Infektion (DIV16) wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch analysiert (2.8) oder für Ca²⁺ Imaging Experimente verwendet (2.12).

2.8 Immunfärbungen

Die heterologe Expression von Proteinen in kultivierten Säugetierzellen (2.7.1.5, 2.7.1.6, 2.7.2.5) wurde durch immunzytochemische Färbungen nachgewiesen. Für die konfokale Mikroskopie (2.9) wurden die Zellen auf PLL-beschichtete Glasplättchen ausgesät (2.7.1.3).

2.8.1 Mito-Tracker[®] Färbung

Zur Visualisierung der Mitochondrien in HEK293-Zellen und corticalen Ratten-Primärkulturen, wurden die Zellen vor der Fixierung mit Mito-Tracker[®] *mitochondrion-selective probes* (Deep Red FM, Life TechnologiesTM) inkubiert. Dazu wurde der Farbstoff in DMSO aufgenommen (Endkonzentration 100 mM) und in Kulturmedium zur gewünschten Endkonzentration verdünnt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit mit 100 nM MitoTracker[®] für 20 - 30 min inkubiert.

2.8.2 Immunzytochemie

Die immunzytochemischen Färbungen von Säugetierzellen zur konfokalen Mikroskopie verliefen nach einem Standardprotokoll für intrazelluläre Färbungen (2.8.2). Alle Inkubationsschritte wurden bei RT in den Vertiefungen der MWP durchgeführt.

Tab. 2-8: Protokoll für immunozytochemische Färbungen für die konfokale Mikroskopie.

Inkubationsschritt	Lösung	Dauer
Waschen 1	PBS	2 x 1 min
Fixieren	4 % PA	5 min
Waschen 2	PBS	3 x 1 min
Präinkubation	CT	30 min
1. AK-Inkubation	CT	60 min
Waschen 3	PBS	3 x 1 min
2. AK-Inkubation	CT	30 min
Waschen 4	PBS	3 x 1 min

Alle Inkubationsschritte wurden bei RT durchgeführt.

PA: 4 % Paraformaldehyd in PBS; CT: 5 % Chemiblocker, 0,5 % Triton-X 100 in PB

Zuerst erfolgte ein Waschschrift der Zellen mit PBS, dann die Fixierung der Zellen mit 4 % Paraformaldehyd (PA). Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Es erfolgte ein Präinkubationsschritt in CT (0,5 % (v/v) Triton-X und 5 % Chemiblocker in PB). Die Zellen wurden für eine Stunde mit dem Erstantikörper inkubiert (Tab. 2-9). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde mit dem Zweitantikörper inkubiert. Der Zweitantikörper war entweder an einen Fluoreszenzfarbstoff (Tab. 2-10) oder an Meerrettichperoxidase (gtarbHRP, Ziege gegen Kaninchen, 1:200, Sigma-Aldrich) gekoppelt.

Tab. 2-9: Verwendete Erstantikörper

Antikörper	Antigen	Spezies	Verdünnung	Herkunft
α Calnexin	Calnexin (ER)	Kaninchen	1:100	Cell Signaling Technology
α MAP	MAP2 (Neruone)	Kaninchen	1:500	Millipore
α GFAP	GFAP (Glia)	Huhn	1:1000	Novus

GFP = Grün fluoreszierendes Protein; MAP2 = Microtubuli- Assoziiertes Protein 2; GFAP = Saures Gliafaserprotein (*Glial fibrillary acidic protein*)

Sekundärantikörper wurden in CT verdünnt und Zellen für 30 Minuten in der Zweitantikörperlösung inkubiert. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS

gewaschen. Bei Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper wurde mit einer Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)-Färbelösung inkubiert.

Tab. 2-10: Verwendete Fluoreszenz-markierte Zweitantikörper (Dianova)

Antikörper	Anregung [nm]	Detektion [nm]	Verdünnung
darbA594 (Esel gegen Kaninchen Alexa 594)	594	580-740	1:1000
darbCy3 (Esel gegen Kaninchen Cy3)	543	552 - 625	1:500
gtachDy649 (Ziege gegen Huhn Dy649)	633	642 - 712	1:800

Bei der Oxidation des DAB entsteht ein braunes, wasserunlösliches Reaktionsprodukt. Die Farbreaktion wurde mit PBS gestoppt. Befanden sich die Zellen auf Glasplättchen, wurden sie mit der Zellseite nach unten mit dem Eindeckmedium Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Eppelheim) auf einem Objektträger konserviert.

<u>DAB-Färbelösung:</u>	10 ml PBS, 250 µl 2 % (w/v) DAB, 40 µl 30 % (v/v) H ₂ O ₂
<u>Phosphat-Puffer (PB):</u>	81 mM NaH ₂ HPO ₄ , 19 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4

2.9 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die immunzytochemisch gefärbten Zellen (2.8) wurden einem Laser Scanning System TCS SP5 von Leica (Heidelberg) analysiert. Als Epifluoreszenzeinrichtung ist ein inverses Fluoreszenzmikroskop angeschlossen. Das System verfügt über einen Argon- und drei Helium/Neon-Laser. Zur Anregung wurden Laserlinien der Wellenlängen 488, 543 und 633 nm verwendet. Die Fluoreszenz konnte in einem Falschfarbenbild dargestellt werden. Um das „Durchbluten“ zwischen den Detektionskanälen bei Mehrfachfärbungen zu vermeiden, wurde sequentiell gescannt, d. h. jeder Farbstoff wurde einzeln angeregt und detektiert. Außerdem wurden nur schmalbandige Ausschnitte in den nicht überlappenden Bereichen der Emissionspektren detektiert (Tab. 2-10). Durch das konfokale Prinzip erhält man im Bild nur Informationen aus einer sehr dünnen Schnittebene des Präparats. Diese „optischen Schnitte“ waren unter den gewählten experimentellen Bedingungen dünner als 1 µm.

2.10 Spektroskopische Analyse von GCaMP3.0 Varianten

Zur Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften von genetisch kodierten Calcium Indikatoren (*genetically encoded calcium indicators*, GECI) wurden Fluoreszenzemissionsspektren der Sensorproteine bei unterschiedlichen $[Ca^{2+}]_{\text{frei}}$ aufgenommen und ausgewertet.

Gereinigte GECI Proteine (2.6.2) wurde in Messpuffer verdünnt (2 μM , pH 7,2, Life TechnologiesTM). Zur Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften von GECI bei unterschiedlichen pH-Werten wurden Messpuffer mit pH 7,6 und pH 8,0 wie in Tsien and Pozzan, 1989 beschrieben hergestellt.

Die Ca^{2+} Titration der GECI erfolgte durch die schrittweise Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{\text{frei}}$ in der Küvette (Quarzglas, Schichtdicke 1 cm). Diese wurde durch Kreuzverdünnung der proteinhaltigen Messlösungen in einem Volumen von 1 ml erreicht (s. Anhang, Tab. 6-5 - Tab. 6-7). Die aus den Verdünnungsschritten resultierende $[Ca^{2+}]_{\text{frei}}$ wurden mit WEBMAXC Standard (MaxChelator, <http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>) kalkuliert.

Emissionsspektren wurden im Bereich von 480 bis 600 nm aufgenommen, die Anregungswellenlänge betrug 470 nm (QM-4, PTI, New Jersey). Die Daten wurden mit Graphpadprism 5.04 ausgewertet. Die Fluoreszenzemissionswerte von Ca^{2+} -freiem Messpuffer ohne Protein wurden als Basislinie definiert und von den Daten subtrahiert.

<u>Messpuffer Ca^{2+} frei:</u>	30 mM MOPS, 100 mM KCl, 10 mM K_2 EGTA
<u>Messpuffer 39 μM Ca^{2+}:</u>	30 mM MOPS, 100 mM KCl, 10 mM CaEGTA
<u>MOPS Puffer:</u>	30 mM 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure, 100 mM KCl, ad pH 7,6 oder pH 8,0
<u>K_2EGTA:</u>	1 M EGTA, 2 M KOH, ad pH 7,6 oder pH 8,0
<u>CaEGTA:</u>	1 M EGTA, 1 M $CaCO_3$, 2 M KOH, ad pH 7-8; Herstellung nach Tsien and Pozzan, 1989

2.11 Calcium-Fluorimetrie

Für die Calcium-Fluorimetrie wurden HEK293-Zellen, die stabil einen GECI exprimierten, sowie nicht transfizierte HEK293-Zellen in 96er MWP bis zu einer Dichte von ca. 2×10^4 Zellen pro Well vermehrt. Die Wildtyp (WT)- Zellen wurden mit dem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4 (Life TechnologiesTM) beladen. Die Bindung von Ca^{2+} Ionen an diesen Fluoreszenzfarbstoff führt zur Änderung seines Absorptions-Emissions-Spektrums. Die Zellen wurden bei RT mit 50 μl Beladelösung (ES) inkubiert, die 3 mM Probenecid, 0,02 % (w/v) Pluronic® F-127 (Sigma, Taufkirchen) und 1,7 μM Fluo-4 AM enthielt. Nach 30 min wurde die Beladelösung durch 90 μl farbstofffreie ES-Lösung ersetzt.

Die MWP wurden in ein Fluoreszenz-Lesegerät überführt (FluoStar Galaxy; BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) und die basale Fluoreszenz aufgenommen. Sowohl der Fluo-4 Farbstoff als auch der verwendete GECI wurden bei 485 nm angeregt, die emittierte Fluoreszenz wurde bei 510 nm gemessen. Sobald das Fluoreszenzsignal konstant war, wurden die Testlösungen zupipettiert. Die Fluoreszenzänderungen wurden automatisch aufgezeichnet. Die Signalverstärkungsleistung des Photomultipliers wurden so angepasst, dass über einen großen dynamischen Bereich eine hohe Messempfindlichkeit gewährleistet war. Das Gerät misst die Vertiefungen der Multiwellplatten nacheinander mit einer definierten Blitzzahl zur Anregung der Fluoreszenz. Alle Messungen wurden mit 15 Blitzen ausgeführt. Nach der Aufzeichnung der basalen Fluoreszenz (i.d.R. über fünf Messzyklen) wurden die Liganden manuell mit einer Mehrkanalpipette zugegeben. Alle Bestimmungen wurden vierfach durchgeführt.

ES Lösung: 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, pH 7,4 (NaOH)

2.12 Ca^{2+} Imaging

Mittels 2-Photonen-*Laser-Scanning* Mikroskopie (2-Photonen-Mikroskopie) wurden Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) von Säugetier-Zellen auf Einzel-Zell-Ebene visualisiert und aufgezeichnet. Dazu wurden Zellen auf PLL-beschichteten Glasplättchen in MWP kultiviert und in eine Messkammer eingespannt. Diese Kammer wurde zur Erhaltung der Zellen sowie dem Einwaschen von Agonisten an ein Perfusionssystem

angeschlossen. Intrazelluläres Ca^{2+} wurde durch Ca^{2+} -sensitive Farbstoffe (Fura-2, Fluo-4) oder durch den GECI GCaMP3.0 detektiert.

2.12.1 Zwei-Photonen *Laser-Scanning* Mikroskopie

Laser sind optische Lichtquellen, die Photonen in einer kohärenten, d.h. phasengleichen Weise emittieren. Laserlicht weist besondere Eigenschaften auf, wie z.B. eine definierte Energie bzw. Farbe (wenige bis Bruchteile von nm) oder eine starke Strahlungsbündelung. In dieser Arbeit wurde für das Ca^{2+} Imaging in Säugetier-Zellen ein Zwei-Photonen Lasersystem verwendet. Es besteht aus einem Titan:Saphir-Festkörperlaser der einen Al_2O_3 -Saphir-Kristall, dotiert mit Ti^{3+} -Ionen, als optisch aktives Medium enthält. Der Titan:Saphir Laser wird von einem frequenzverdoppelten Neodym-Vanadate-(Nd:YVO₄)-Laser (grün: 532nm) optisch gepumpt. Er kann Wellenlängen von 670 bis 1070 nm erzeugen (in dieser Arbeit verwendet: MaiTai HPDS von Newport/Spectra Physics, 690-1040 nm) und hat ein Leistungsmaximum bei 800 nm.

Durch Anregung des optisch aktiven Mediums (des Titan-Saphir-Kristalls) mit grünem Licht wird breitbandig (670-1070 nm) Licht erzeugt. Ein Teil dieser Photonen wird im optischen Resonator hin und her reflektiert, wobei bei jedem Durchgang durch das Titan-Saphir-Kristall das Licht verstärkt wird. Der optische Weg im Resonator bestimmt dabei die Wellenlänge und die Vielfachreflektion sorgt für die geringe Strahldivergenz. Ein weiterer optischer Effekt für kohärente Strahlung, die (hier passive) Modenkopplung sorgt dafür, dass das Laserlicht nicht kontinuierlich, sondern in kurzen Pulsen ($< 100\text{fs}$) mit hoher Wiederholfrequenz (80 MHz) den Laser verlässt. Dafür wird an einem Resonatorende ein 90%-Spiegel verwendet, so dass 10% der Laserleistung als Ausgangsleistung für die Experimente zur Verfügung stehen. Das gepulste Licht hat eine höhere Leistung als ein kontinuierlich strahlender Laser, da die Photonen zwischen den Pulsen gesammelt werden.

Normalerweise wird der Fluophor durch ein Photon einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Diese Energie kann auch in Form von zwei Photonen einer längeren, energieärmeren Wellenlänge zugeführt werden. Die beiden Photonen müssen dann allerdings nahezu gleichzeitig auf das Farbstoffmolekül treffen. So kann das angeregte Niveau des Fluophors ebenfalls erreicht werden und ein Photon aus dem Emissionsband des Fluophors wird abgestrahlt (Abb. 2-1).

Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Photonen gleichzeitig absorbiert werden, ist erst dann ausreichend hoch, wenn eine hohe Photonendichte vorliegt. Diese wird durch die

Fokussierung des Lasers auf ein sehr kleines Anregungsvolumen von ungefähr einem Femtoliter sowie durch die gepulste Natur des Laserlichts (<100 fs) erreicht.

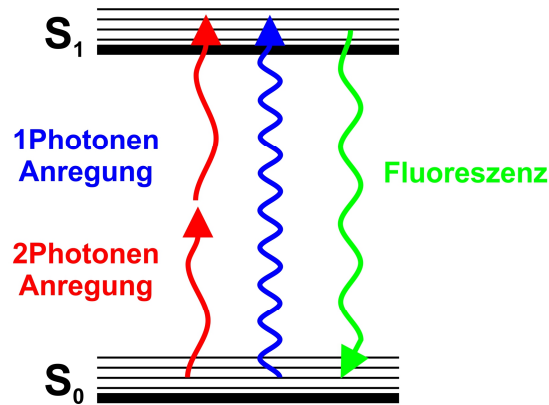


Abb. 2-1: Schematische Darstellung der Zwei-Photonen Anregung. Der Fluorophor befindet sich zunächst im elektronischen Grundzustand S_0 . Ein Photon wird absorbiert und steigert die Energie des Elektrons des Fluorophors. Hat das Photon eine hohe Energie, wird das Elektron in den Anregungszustand S_1 gehoben (blauer Pfeil). Ist das Anregungslicht langwellig und energiearm, muss ein zweites Photon absorbiert werden, um das Elektron in den Anregungszustand S_1 zu heben (zwei rote Pfeile). Bei beiden Anregungsarten wird die Energie als Emissionslicht abgegeben (grüner Pfeil).

2.12.2 Funktionsweise des Messstandes

Der Messstand bestand aus einem aufrechten Mikroskop, dem Lasersystem zur Anregung (MaiTai HPDS) und einer Detektionseinheit für die Fluoreszenz. Der Laserstrahl wurde durch einen dichroitischen Spiegel durch das Objektiv auf die Probe fokussiert. Direkt vor dem Eingang ins Mikroskop befand sich ein Strahl-Scanner (Till Photonics) bestehend aus zwei schnell verstellbaren galvanischen Spiegeln, die die Position des Laserfokus im Objekt in μs verändern kann. Vor dem Objektiv konnten Leistungen des Lasers von bis zu 300 mW gemessen werden. Bei dem Objektiv handelte es sich um ein LUMPlanFL / IR (60 x) Wasserimmersionsobjektiv (Olympus Optical Co. Ltd) mit einer numerischen Apertur von 0,90. Das Mikroskop (BX50WI, Olympus Optical Co. Ltd) befand sich auf einem schwingungsgedämpften Tisch in einem lichtdichten Käfig. Die Messkammer wurde auf den beweglichen Tisch des Mikroskops aufgesetzt. Das erzeugte Fluoreszenzlicht wurde durch dasselbe Objektiv gesammelt und durch den dichroitischen Spiegel auf einen Photomultiplier

geleitet. Die weitere Signal- und Bildverarbeitung und -erstellung erfolgte mit dem Programm FV300 (Olympus Optical Co. Ltd).

Das Ca^{2+} Imaging wurde in einer Plexiglaskammer (angefertigt durch die Werkstatt des ICS-4) mit einem Glasboden und einem Volumen von ca. 400 μl durchgeführt (Abb. 2-2, unten).

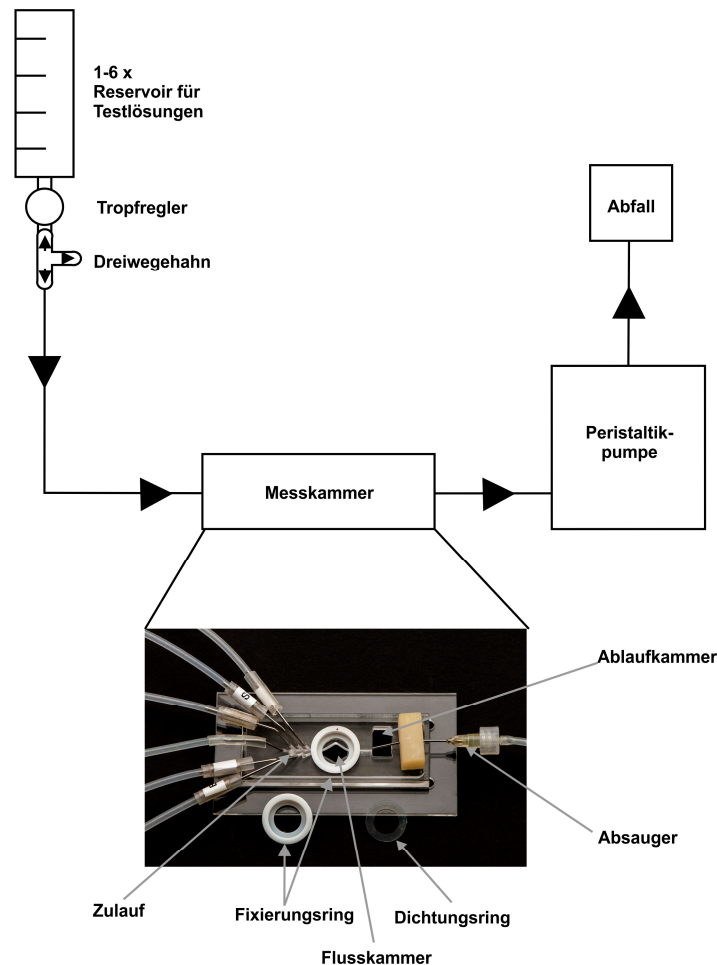


Abb. 2-2: Perfusionssystem für das Ca^{2+} Imaging. Für das Ca^{2+} Imaging auf Einzelzellniveau wurde ein Schwerkraft-basiertes Perfusionssystem verwendet. Die Extrazellulärlösung (ES) sowie bis zu 5 verschiedene Testlösungen (ES + Agonist) wurden in 50 ml-Spritzen gefüllt, die in 1 m Höhe über der Messkammer installiert wurden. Die Spritzen wurden über einen Tropfregler zur Feinjustierung der Flussgeschwindigkeit an ein Schlauchsystem angeschlossen. Jedes Lösungsreservoir konnte über einen Dreizehnhahn an der Spritze manuell geöffnet oder geschlossen werden. Über feine Bohrungen (links im Bild) konnten die Lösungen in die Messkammer gespült werden. Die Deckgläschen mit den Zellen wurden mit der bewachsenen Seite nach unten über der rautenförmigen Flusskammer platziert, sodass die Zellen kontinuierlich der fließenden Lösung ausgesetzt waren. Das Plättchen wurde mit Hilfe eines Dichtungs- und eines Fixierrings in der Kammer befestigt. In das so entstandene Reservoir wurde ES gefüllt, in welches das Objektiv getaucht wurde. Als Absaugevorrichtung für überschüssige Lösung aus der Ablaufkammer diente eine Peristaltikpumpe.

Die mit den Zellen bewachsenen Deckgläschen wurden vorsichtig über der mit Extrazellulär-Lösung (*Extracellular Solution*, ES) gefüllten, rautenförmigen Flusskammer platziert, sodass die Zellen von der Lösung kontinuierlich umspült wurden. Darüber wurde ein Dichtungsring aus dünnem Silikon gelegt, der mit einem Fixierring aus Kunststoff befestigt wurde. Das so entstandene zur Flusskammer hin abgedichtete Reservoir wurde mit ES gefüllt. In die Flüssigkeitskuppel wurde das Objektiv des Mikroskops eingetaucht.

Die Messlösungen wurden in bis zu sechs verschiedene 50 ml-Spritzen gefüllt, die etwa 1 m oberhalb der Messkammer installiert wurden. Die Spritzen wurden über Dreiwegehähne manuell geöffnet oder geschlossen, sodass die gewünschte Messlösung über einen Plastikschlauch (Tygon, Neolab, Heidelberg) kontinuierlich in die Kammer gespült wurde. Die Flussgeschwindigkeit der Messlösungen wurde über einen zwischen die Spritze und den Dreiwegehahn geschalteten Präzisionstropfregulator (Exadrop[®], B.Braun Melsungen AG) auf 2 ml/min eingestellt. Überschüssige Lösung wurde durch die nachströmende Lösung in die Ablaufkammer verdrängt und mit einer Peristaltik-Pumpe abgesaugt. Eine Übersicht über das Perfusionssystem ist in Abb. 2-2 gezeigt.

2.12.3 Messung und Auswertung

Für Imaging-Experimente mit einem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff wurden die Zellen mit dem Farbstoff gemäß einem Standardprotokoll beladen (Tab. 2-11). Ein Deckgläschen, dass mit Zellen bewachsen war, wurde vorsichtig (Zellen nach unten) in der Mitte der Messkammer platziert. Während der Messung wurde die Messkammer mit Hilfe der Perfusion kontinuierlich mit Lösung durchströmt.

Tab. 2-11: Protokoll für die Beladung von Säugetierzellen mit Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffen

Farbstoff	Konzentration	Probenicid	Pluronic	Inkubationsdauer
Fluo-4 AM Ester	1,7 μM	3 mM	0,02 %	15 min
Fura-2 AM Ester	2 μM	3 mM	0,02 %	10 min

Es konnten maximal sechs unterschiedliche Lösungen in die Messkammer gespült werden. Mit Hilfe einer roten Leuchtdiode wurde im Durchlichtmodus das Deckgläschen positioniert und mit dem Fokustrieb scharf eingestellt. Die Anregungswellenlänge hing von dem verwendeten Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff oder GECI ab.

Es wurden Zeitreihen mit einer Auflösung von 256 x 256 oder 512 x 512 Bildpunkten pro Bild aufgenommen. Die Aufnahmefrequenz hing von der verwendeten Auflösung und Scanqualität ab (Tab. 2-12).

Tab. 2-12: Aufnahmefrequenzen während des Ca²⁺ Imaging

Bildabmessung [Pixel x Pixel]	Scangeschwindigkeit	Bild / s
256 x 256	Slow	1
512 x 512	Fast	0,8
512 x 512	Slow	0,5

Die Zeitreihen wurden im Tiff-Format abgespeichert und mit dem Programm Image J (National Institute of Health, USA) ausgewertet. Mit diesem Programm konnte die Intensität in definierten Arealen (*Region of Interest*, ROI) pro Bild der Zeitreihe bestimmt werden. Für jedes Areal wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensität pro Bild als Textdatei ausgegeben und im Tabellenkalkulationsprogramm Excel weiterbearbeitet. Weiterhin wurden fünf ROIs in Regionen gelegt, in denen keine Zellen lokalisiert waren, um die Hintergrundfluoreszenz zu ermitteln. Weiterhin wurde die Basalfluoreszenz bestimmt, indem die Fluoreszenz, die 5 - 30 s vor der ersten Applikation der Testlösung gemessen wurde, gemittelt wurde. Sowohl die Hintergrundfluoreszenz als auch die Basalfluoreszenz wurde von den Messwerten abgezogen. Die daraus erhaltenen Messwerte wurden nach folgender Formel normiert:

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{F - F_0}{F_0}$$

Als weitere Auswertemethode wurden Linescans benutzt. Dazu wurde eine Linie einer definierten Länge durch HEK293-Zellen gezogen. Für jeden Pixel entlang der Linie wurde die Fluoreszenzintensität bestimmt und farbcodiert. Die Analyse wurde für jedes Bild einer Stimulationsreihe wiederholt und zeitabhängig aufgetragen.

Außerdem wurde die Signaleinsatzzeit ausgewertet. Sie ist definiert als die Zeit, die von Beginn der Stimulation bis zur Detektion des Signals vergeht. Dabei wird der Beginn des Signals als der Punkt definiert, an dem die normierte Fluoreszenzintensität $\Delta F/F_0$ einen

Schwellenwert zum ersten Mal im Stimulationszeitraum überschreitet. Der kritische Schwellenwert x ist definiert als

$$x = 2 \times t \times \left(\frac{\sigma}{F_0} \right)$$

wobei t = t-Wert mit 99% Wahrscheinlichkeit, dass es sich um ein Signal handelt
 σ = Standardabweichung der Basalfluoreszenz.
 F_0 = Basalfluoreszenz

2.13 Software

In Tab. 2-13 sind die Namen der Software, mit der die Daten aufgezeichnet und ausgewertet wurden, aufgeführt. Es werden ebenfalls die Programme genannt, mit deren Hilfe die Abbildungen erstellt wurden, sowie das verwendete Textverarbeitungsprogramm.

Tab. 2-13: Verwendete Software

Software	Verwendung	Hersteller/ Autor
Windows 7	Betriebssystem	Microsoft
LAS-AF	Datenerfassung	Leica
FluoView	Datenerfassung	Olympus
Felix32 TM v1.2	Datenerfassung	PTI
Excel 2007	Datenauswertung	Microsoft
Gentle	Datenauswertung	Magnus Manske, Universität zu Köln
Graphpad Prism 5.04	Datenauswertung	GraphPad Software
WCIF ImageJ 1.47v	Datenauswertung Bildbearbeitung	Wayne Rasband, NIH, USA
CorelDRAW 12 und 15	Bildbearbeitung	Corel Cooperation
Word 2007	Textverarbeitung	Microsoft

3 Ergebnisse

Ca^{2+} ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff, der eine Vielzahl zellulärer Reaktionen reguliert bzw. moduliert. Die Untersuchung der zeitlichen und räumlichen Dynamik dieses Botenstoffes ist notwendig, um intrazelluläre Signalmechanismen besser zu verstehen. Neben elektrophysiologischen Methoden mit denen Ca^{2+} Ströme direkt gemessen werden können, gewinnt die optische Darstellung von Ca^{2+} Signalen immer mehr an Bedeutung. Bis vor kurzem standen dazu nur synthetische, Ca^{2+} -sensitive Farbstoffe wie z.B. Fluo-4 oder Fura-2 zur Verfügung. Als attraktive Alternative werden seit einigen Jahren genetisch kodierte Ca^{2+} Indikatoren (genetically encoded calcium indicators, GECI) eingesetzt.

Die Transfektion eukaryotischer Zellen mit dem GECI GCaMP3.0 führt i.d.R. zu einer homogenen Verteilung des Proteins im Zytoplasma. Um lokale Ca^{2+} Signale in verschiedenen subzellulären Kompartimenten, wie z.B. den Mitochondrien, messen zu können, wurde GCaMP3.0 in dieser Arbeit gezielt gentechnisch modifiziert. Durch das Anfügen kurzer Signalsequenzen gelang es das Sensorprotein sowohl an die Plasmamembran als auch in die Matrix und die Außenmembran von Mitochondrien zu lenken.

In dieser Arbeit wurden HEK293-Zellen als Modellsystem für die genaue Analyse des Einflusses der angefügten Sequenzen auf die Lokalisierung und Funktionalität von GCaMP3.0 verwendet. Die modifizierten Varianten sollten weiterhin genutzt werden, um die räumliche und zeitliche Dynamik von Ca^{2+} Signalen in Neuronen zu untersuchen. Mit konventionellen Transfektionsmethoden ist es jedoch schwierig Fremdgene in Neuronen oder Gliazellen zu exprimieren. In jüngerer Vergangenheit wurden verschiedene virale Transduktionsverfahren als vielversprechende Alternativmethoden entwickelt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die modifizierten GCaMP Konstrukte daher in einen Vektor kloniert, mit dem rekombinante Adeno-assoziierte Viren (rAAV) verschiedener Serotypen hergestellt werden konnten. Diese rAAV eignen sich als Genfähren, um GCaMP3.0 sowohl in kultivierten kortikalen Neuronen als auch in HEK293-Zellen funktionell zu exprimieren.

3.1 Detektion von Ca^{2+} Signalen mit Fluo-4 und GCaMP3.0

In dieser Arbeit soll der GECI GCaMP3.0 (Tian et al., 2009) modifiziert und für Ca^{2+} Messungen verwendet werden. Dieser Sensor ist in seinen spektralen Eigenschaften vergleichbar mit Fluo-4. Zunächst wurden die Eigenschaften des unmodifizierten GCaMP3.0

untersucht. Dazu wurde eine HEK293-Zelllinie verwendet, die stabil den Octopaminrezeptor 1b aus D. melanogaster (DmOct α R1b) exprimiert (Balfanz et al., 2005). Bindet Octopamin an diesen Rezeptor, wird eine G-Protein vermittelte Signalkaskade aktiviert, die zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern führt. Zunächst wurden die HEK293-DmOct α R1b-Zellen mit Fluo-4 beladen und mit Octopamin-freier ES-Lösung umspült (Abb. 3-1A, links). Nachdem die Perfusion auf ES-Octopamin (10 nM) umgeschaltet wurde, konnte ein Anstieg der Fluo-4 Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 3-1A, rechts).

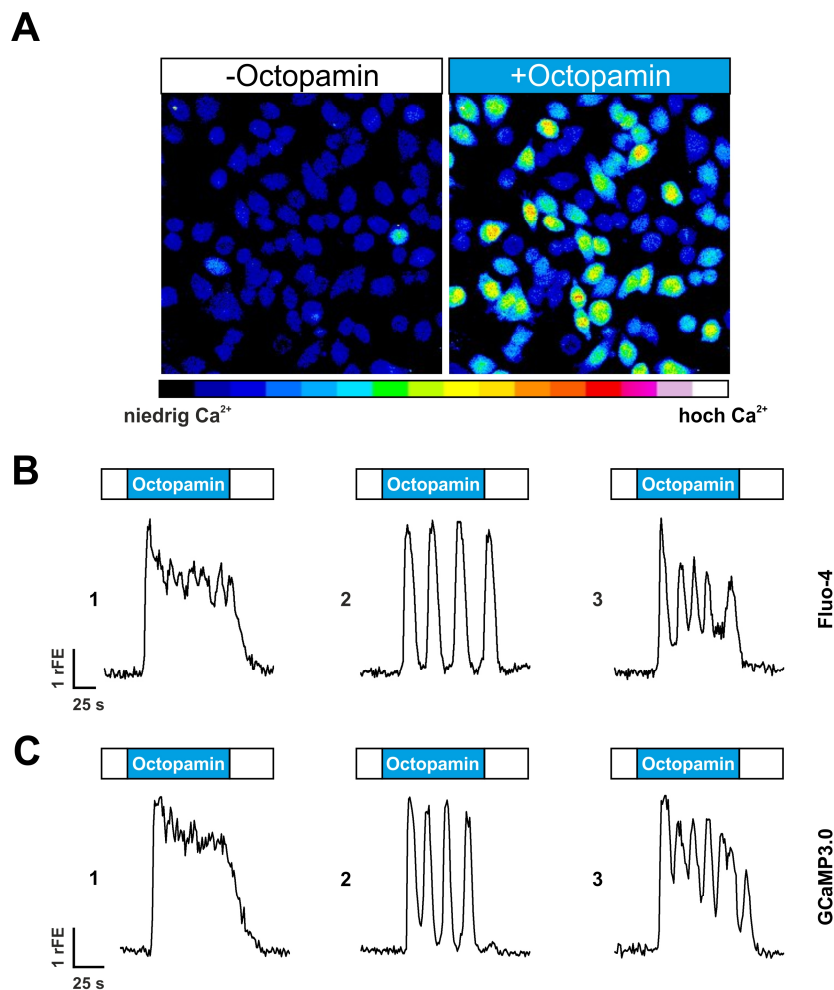


Abb. 3-1: Octopamin induzierte Ca^{2+} Signale in HEK293-DmOct α R1b-Zellen. (A) Mit Fluo-4 beladene HEK293-DmOct α R1b-Zellen wurden abwechselnd mit ES (links) und ES-Octopamin (rechts) umspült. In Anwesenheit von Octopamin stieg das Fluoreszenzsignal als Reaktion auf die durch die Bindung von Octopamin an den Rezeptor induzierte Signalkaskade. Die relative $[\text{Ca}^{2+}]$ ist farbkodiert. Die Octopamin induzierte Änderung der Ca^{2+} Signale konnte drei Antworttypen zugeordnet werden: (B) Fluo-4: (1) transiente Signale, (2) Oszillationen, (3) Oszillationen mit erhöhter Basalfluoreszenz. (C) Mit pscGCaMP3.0 transfiziert: (1) transiente Signale, (2) Oszillationen, (3) Oszillationen mit erhöhter Basalfluoreszenz. rFE = relative Fluoreszenzeinheit; s = Sekunden; weiße Kästen = ES; blaue Kästen = ES-Octopamin.

In Abb. 3-1B ist der zeitliche Verlauf der Octopamin-abhängigen Änderungen der Fluo-4 Fluoreszenz in einzelnen Zellen dargestellt. Etwa 4 % der Zellen ($n = 164$) reagierten auf die Stimulation mit 10 nM Octopamin mit einem transienten Einstrom von Ca^{2+} . Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ blieb über die gesamte Dauer der Stimulation erhöht (Abb. 3-1B1). Der Großteil der Zellen zeigte einen sich wiederholenden Anstieg und Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (87 %, $n = 164$, Abb. 3-1B2). Diese Oszillationen stoppten nach dem Umschalten der Perfusion auf Octopamin-freie ES Lösung (Abb. 3-1B2). Die restlichen 9 % der Zellen ($n = 164$) zeigten ebenfalls Ca^{2+} Oszillationen (Abb. 3-1B3). Die Signale gingen jedoch zwischenzeitlich nicht auf das Ca^{2+} Ausgangsniveau zurück (vgl. Abb. 3-1B2). Wurden die HEK293-DmOct α R1b-Zellen mit GCaMP3.0 transfiziert, wurden vergleichbare Ca^{2+} Signale beobachtet ($n = 244$ Zellen, Abb. 3-1C1-3). Die Varianten 1 und 3 wurden bei 12 % bzw. 27 % der Zellen gemessen. Wiederum der prozentual größte Anteil der Zellen (62 %) zeigte Ca^{2+} Oszillationen, wie sie auch mit Fluo-4 gemessen wurden (vgl. Abb. 3-1B2 und Abb. 3-1C2).

Die Experimente zeigten, dass GCaMP3.0 die Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zuverlässig detektiert und auch dynamische Signaländerungen, wie Ca^{2+} Oszillationen, darstellen kann. Somit sind Fluo-4 und GCaMP3.0 für ähnliche Anwendungen gleichwertig einsetzbar.

Vergleicht man die subzelluläre Verteilung von Fluo-4 (Abb. 3-2A) mit der von GCaMP3.0 (Abb. 3-2B) ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen.

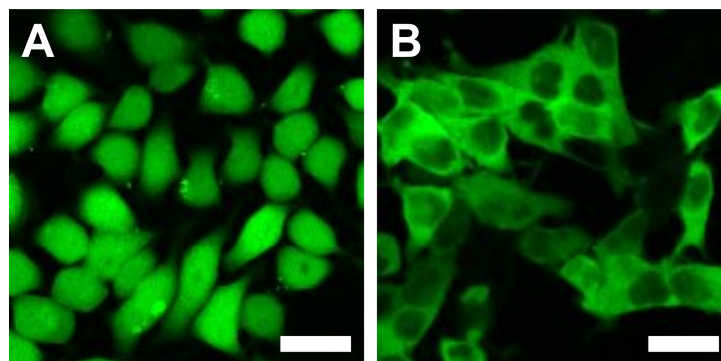


Abb. 3-2: Subzelluläre Verteilung von Ca^{2+} Indikatoren in HEK293-DmOct α R1b-Zellen. HEK293-DmOct α R1b-Zellen wurden entweder mit (A) Fluo-4 (1,7 μM) beladen oder (B) mit pscGCaMP3.0 (10 μg) transfiziert. Die subzelluläre Verteilung der Ca^{2+} Indikatoren wurde fluoreszenzmikroskopisch am 2-Photonen Mikroskop analysiert. Der eingezeichnete Balken entspricht 30 μm .

Fluo-4 ist homogen in der gesamten Zelle verteilt. Im Gegensatz dazu ist die GCaMP3.0-Fluoreszenz deutlich stärker im Zytosol und kaum im Kern zu erkennen. Somit sollte eine

subzelluläre Auflösung der Ca^{2+} Signale bei Verwendung von GCaMP3.0 im Vergleich zu Fluo-4 möglich sein. Aufgrund der Lokalisierung von GCaMP3.0 wird diese unmodifizierte Variante im weiteren Verlauf dieser Arbeit als cytGCaMP3.0 bezeichnet. Ein Vorteil eines GECI ist, dass das kodierende Gen molekularbiologisch modifiziert werden kann. Durch das Anfügen spezifischer Signalsequenzen kann die Lokalisierung des Proteins in verschiedenen subzellulären Kompartimenten erreicht werden, sodass Änderungen lokaler $[\text{Ca}^{2+}]$ gemessen werden können.

3.2 Herstellung und Expression von spezifisch lokalisierten GCaMP3.0-Varianten

3.2.1 Klonierung der GCaMP3.0-Varianten

Das Plasmid pCMV-GCaMP3.0 diente als Grundlage für die gerichtete Mutagenese von GCaMP3.0 mittels überlappender PCR. In einem mehrstufigen Prozess wurde die GCaMP3.0-Sequenz sukzessive um Teilstücke der gewünschten Lokalisierungssequenz verlängert. Eine Übersicht über die Klonierungsstrategie ist in Abb. 3-3 dargestellt.

Bei Modifikationen am 5'-Ende von GCaMP3.0 wurde der erste Teil der Signalsequenz (S-5'a, rot), durch den ersten forward Primer (rot) an die Originalsequenz angefügt. Am 3'-Ende wurde der reverse Primer (orange) so konzipiert, dass er eine Restriktionsschnittstelle (R2) enthielt (s. Abb. 3-3, links). Bei Modifikationen am 3'-Ende enthielt der forward Primer (orange) eine Restriktionsschnittstelle (R1), ein Kozak-Konsensusmotiv (CCACC; Kozak, 1986) und das Startcodon. Der erste Teil der Signalsequenz (S-3'a, rot) wurde durch den Reverse-Primer (rot) angefügt (s. Abb. 3-3, rechts).

Das Fragment I diente als Matrize für weitere PCR-Amplifikationen, in denen die GCaMP3.0-S-5'a Sequenz um einen weiteren Teil der Signalsequenz (S-5'b, blau) erweitert wurde. Weitere Amplifikationen wurden auf den entstandenen PCR Fragmenten durchgeführt, bis die Signalsequenz vollständig angefügt war. In der letzten PCR wurde am modifizierten 5'-Ende zusätzlich eine Restriktionsschnittstelle (R1), eine Kozak Konsensussequenz (CCACC; Kozak, 1986) und ein Startcodon (ATG) eingefügt. Fragment II wurde für Konstrukte verwendet, die am 3'Ende modifiziert werden sollten. In der letzten PCR wurde ein Stoppcodon (TGA) und eine Restriktionsschnittstelle R2 eingefügt (blau).

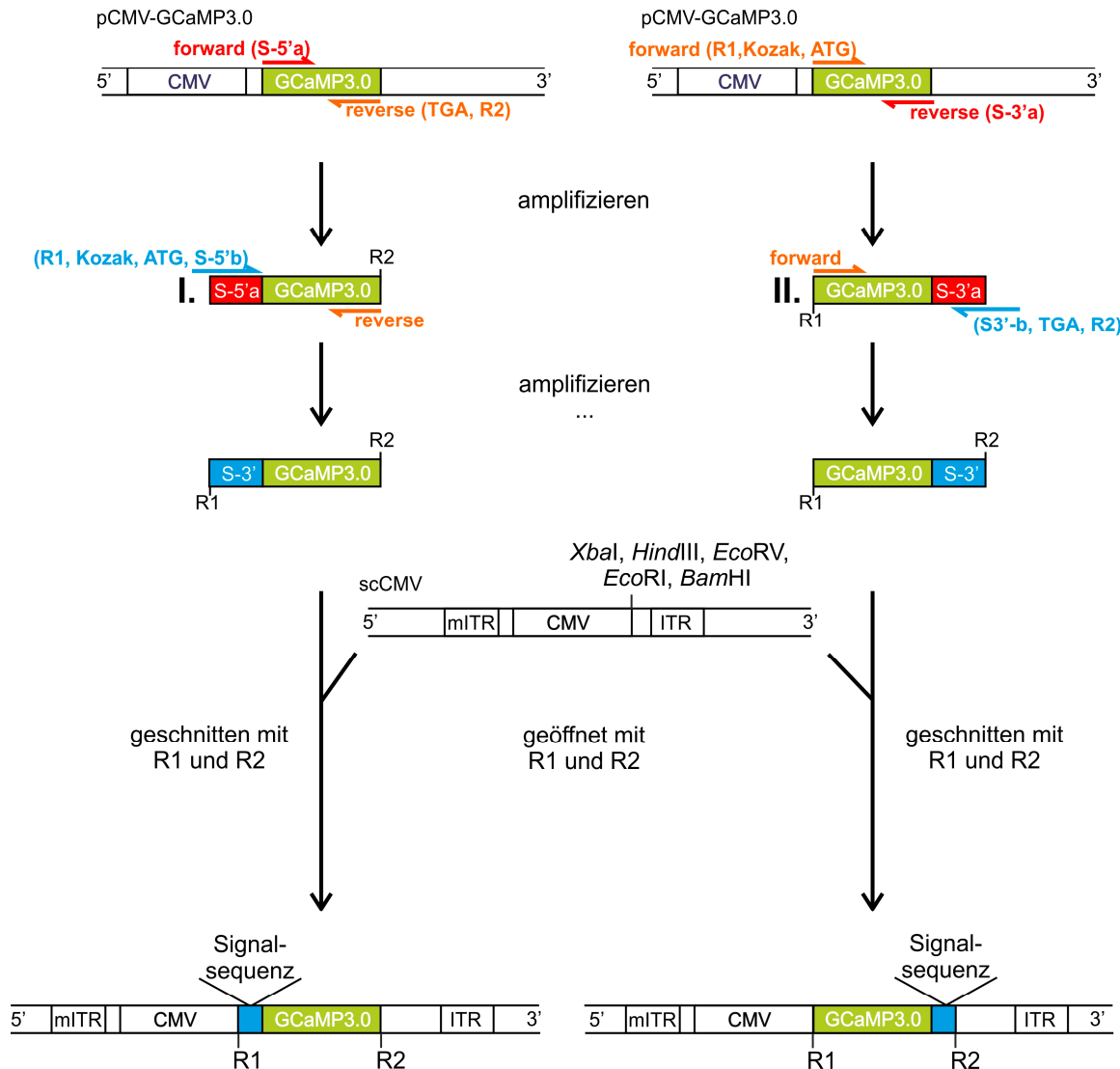


Abb. 3-3: Klonierungsstrategie der GCaMP3.0-Varianten mit Lokalisierungssequenzen. Das GCaMP3.0 kodierende Gen wurde mittels überlappender PCR in mehreren Schritten amplifiziert und modifiziert. In der ersten PCR wurde der erste Teil der Signalsequenz über den forward Primer (S-5'a, links) am 5'-Ende oder den reverse Primer (S-3'a, rechts) am 3'-Ende angefügt (Primer und Sequenzen sind rot gekennzeichnet). Der entsprechende Gegenprimer des Primerpaars (orange) enthielt entweder eine Restriktionsschnittstelle (R2) am 3'-Ende des Gens (siehe I) oder eine Restriktionsschnittstelle (R1) am 5'-Ende des Gens sowie ein Kozak Konsensusmotiv (CCACC) und ein Startcodon (siehe II). Die nächste PCR wurde auf dem Fragment I bzw. II durchgeführt, wobei ein weiterer Teil der Signalsequenz (S-5'b/S-3'b, blau) durch neue Primer angefügt wurde. Die entsprechenden Gegenprimer (orange) wurden wieder verwendet. Diese Strategie wurde solange mit den Fragmenten aus der vorangegangenen PCR wiederholt, bis die Signalsequenz vollständig war. Alle modifizierten Konstrukte enthielten außer der angefügten Signalsequenz (blau) eine Restriktionsschnittstelle R1, ein Kozak Konsensusmotiv und ein Startcodon am 5'Ende sowie ein Stopcodon (TGA) und eine Restriktionsschnittstelle R2 am 3'Ende. Die PCR Fragmente und der Vektor pscCMV wurden mit den Enzymen R1 und R2 geschnitten und ligiert.

Die PCR Produkte für die verschiedenen Varianten waren zwischen 1414 und 1517 Bp groß (Abb. 3-4A; momGCaMP3.0, 1472 Bp). Die PCR-Fragmente und das virale Plasmid pscCMV wurden mit den Enzymen R1 und R2 restringiert und ligiert. Positive Klone wurden durch einen analytischen Restriktionsverdau identifiziert. In Abb. 3-4B ist exemplarisch die Restriktion mit *XhoI* und *BamHI* (R2) von pscGCaMP3.0-Plasmiden gezeigt, von denen vier eine Signalsequenz zur Lokalisation des Proteins in der äußeren mitochondrialen Membran (*mitochondrial outer membrane*, mom) tragen (#1-3 und #5; pscmomGCaMP). Mehrere Klone wurden ausgewählt und sequenziert, um zu überprüfen, ob die Modifikation des Konstrukts wie geplant erreicht wurde.

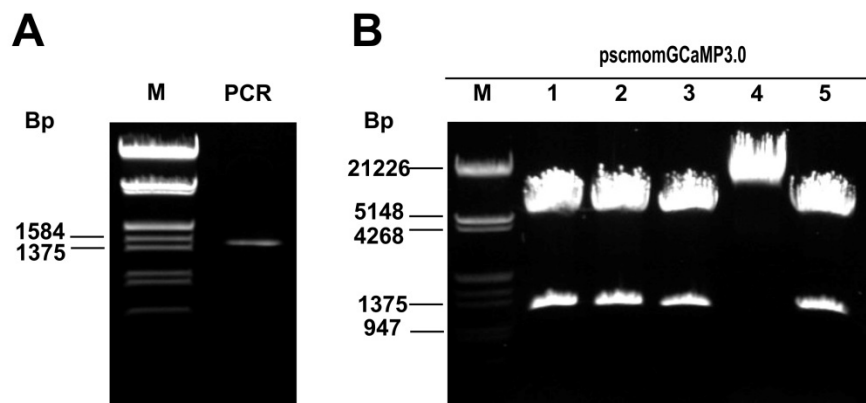


Abb. 3-4: Klonierung der GCaMP3.0-Varianten mit einer Signalsequenz für die Assoziation mit der mitochondrialen Außenmembran. (A) Die Konzentration des restriktionsverdauten, modifizierten PCR Fragments wurde vor der Ligation mit pscCMV mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt. (B) Positive Klone (hier pscmomGCaMP3.0) wurden durch eine analytische Restriktion mit *XhoI* und *BamHI* identifiziert. pscmomGCaMP3.0 #1-3 und #5 enthielten das erwartete Fragment und wurden sequenziert. Einige Fragmentgrößen des Markers (M) sind in Basenpaaren (Bp) angegeben.

3.2.2 Subzelluläre Verteilung der GCaMP3.0-Varianten

Zur Lokalisierung von GCaMP3.0 an der Plasmamembran wurde die Sequenz des Sensorproteins um ein Signalpeptid erweitert, das aufgrund postrationaler Modifikationen eine Assoziation an die Plasmamembran bewirkt (Walsh et al., 2005).

Zunächst wurde GCaMP3.0 C-terminal um das Membranlokalisierungsmotiv der GTPase HRas (Hancock et al., 1991) erweitert. Dieses Motiv enthält eine C-terminal gelegene CaaX-Box (C = Cystein, a = aliphatische Aminosäure, X = beliebige, kleine Aminosäure). Das Cystein wird farnesyliert. Anschließend wird der „aaX“-Anteil proteolytisch entfernt und die Carboxyl-Gruppe des Cysteins, das nun den neuen C-Terminus bildet, wird methyliert.

Zusätzlich werden zwei Cysteine in unmittelbarer Nachbarschaft palmitoyliert. Diese „Lipidanker“ bewirken eine Assoziation von HRas an die Zellmembran. Das entsprechend modifizierte Sensorprotein (GCaMP3.0-CaaX) wurde in HEK293-Zellen exprimiert und die subzelluläre Verteilung fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb. 3-5A).

Das GCaMP3.0-CaaX Protein war vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert. Auch der Kern war teilweise angefärbt (Abb. 3-5A). Das subzelluläre Verteilungsmuster ähnelte dem der nicht modifizierten, zytosolischen Variante cytGCaMP3.0 (Abb. 3-5B). Als Positivkontrolle wurde ein EGFP Konstrukt exprimiert, das ebenfalls mit dem HRas-Motiv fusioniert worden war (EGFP-CaaX, Abb. 3-5C). Dieses Protein wurde vorwiegend an den äußeren Rändern der Zellen detektiert, während im Zytoplasma nur wenige „Aggregate“ sichtbar waren (Abb. 3-5C, Pfeile).

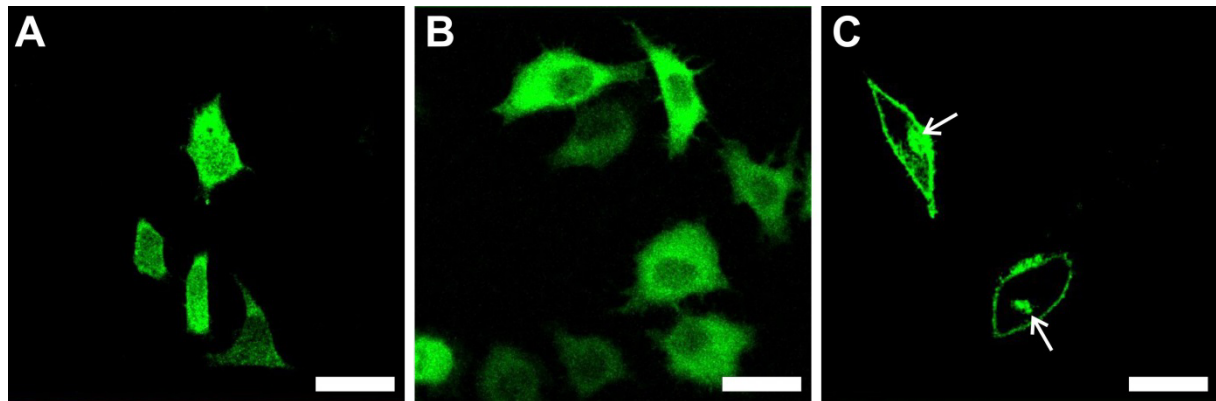


Abb. 3-5: Transiente Expression von GCaMP3.0-CaaX, cytGCaMP3.0 und EGFP-CaaX in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit (A) pscGCaMP3.0-CaaX (10 µg), (B) pscGCaMP3.0 (10 µg) oder (C) pscEGFP-CaaX (8 µg) transfiziert. Die Verteilung der Proteine wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Pfeile markieren intrazelluläre „Aggregate“. Der eingezeichnete Balken entspricht 30 µm.

Da das HRas-Motiv als Signal für den sekretorischen Transportweg zur Plasmamembran dient und die Methylierung des Cysteins in der CaaX-Box am ER stattfindet, bestehen diese „Aggregate“ vermutlich aus EGFP-CaaX, das sich noch am ER befindet (Abb. 3-5C, Pfeil). Das Verteilungsmuster von EGFP-CaaX zeigt jedoch, dass das HRas-Motiv ausreicht, um ein normalerweise zytoplasmatisch lokalisiertes Protein wie EGFP an die Plasmamembran zu lenken. Allerdings reicht dieses Motiv offensichtlich nicht, um auch GCaMP3.0 an die Plasmamembran zu lenken (Abb. 3-5A).

In dem beschriebenen GCaMP3.0-CaaX Konstrukt wurde das HRas Motiv unmittelbar an die Sequenz des Calmodulins fusioniert. Anhand der Kristallstruktur von Ca^{2+} gebundenem

GCaMP2 (Wang et al., 2008; vgl. Abb. 1-4B) wurde gezeigt, dass Calmodulin eine sehr kompakte Struktur besitzt. Ein kurzes Peptid, wie das HRas-Motiv, könnte maskiert und dadurch die erforderlichen posttranslationalen Modifikationen verhindert werden. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden Konstrukte hergestellt, die 10 bzw. 28 Aminosäuren lange „Spacer“ zwischen dem Calmodulin und der CaaX-Signalsequenz enthielten.

Zunächst wurde ein zehn Aminosäuren langer poly-Glycin-Serin Linker eingefügt (GCaMP3.0-10aa-CaaX, Abb. 3-6B). Auch diese Variante war hauptsächlich zytoplasmatisch verteilt. Im Gegensatz zu GCaMP3.0-CaaX (Abb. 3-6A) wurde jedoch kaum Fluoreszenz im Kern detektiert. Daher wurde der Spacer um weitere 18 Aminosäuren verlängert (GCaMP3.0-28aa-CaaX, Abb. 3-6C). Das Verteilungsmuster war sehr ähnlich zu dem der EGFP-CaaX Kontrolle. Das Protein befand sich an den äußeren Rändern der Zelle (Abb. 3-6C) sowie in einigen Aggregaten (Pfeil) im Zytoplasma. Zusätzlich wurden Zellen gefunden, in denen das Protein im Zytoplasma lokalisiert war (Pfeilkopf). Dennoch schien durch den größeren Abstand der Signalsequenz zum Calmodulin eine Lokalisierung an der Plasmamembran begünstigt zu werden. Allerdings reicht der Anteil dieser GCaMP3.0 Variante in der Plasmamembran nicht aus, um lokale Ca^{2+} Signale zuverlässig messen zu können. Daher wurde im Folgenden ein anderes Signalmotiv gewählt und vor den N-Terminus des Proteins (= M13-Peptid) kloniert. Das neue Lokalisierungsmotiv umfasste die 21 N-terminal gelegenen Aminosäuren von Neuromodulin (*Growth Associated Protein 43*, GAP43; Skene and Virag, 1989; Zuber et al., 1989). GAP43 ist normalerweise zytoplasmatisch lokalisiert. Werden zwei benachbarte Cysteine (C_3 und C_4) in der Signalsequenz jedoch palmitoyliert, wird das Protein effizient in der Plasmamembran verankert.

Gleichzeitig mit dem GAP43-Motiv wurde ein 28 Aminosäuren langer Linker zwischen die Signalsequenz und den Beginn des GCaMP3.0-Proteins eingefügt (GAP43-28aa-GCaMP3.0), da sich die Länge dieses Linkers bereits bei GCaMP3.0-28aa-CaaX positiv ausgewirkt hatte. Das Konstrukt wurde in HEK293-Zellen exprimiert und das Verteilungsmuster fluoreszenzmikroskopisch überprüft (Abb. 3-6D). Die Verteilung von GAP43-28aa-GCaMP3.0 ähnelt dem von EGFP-CaaX. Fluoreszenzsignale wurden überwiegend in der Zellmembran beobachtet. Im Zytosol waren nur sehr schwache Signale detektierbar. Diese GCaMP3.0 Variante wurde als pmGCaMP3.0 bezeichnet und für weitere Untersuchungen benutzt.

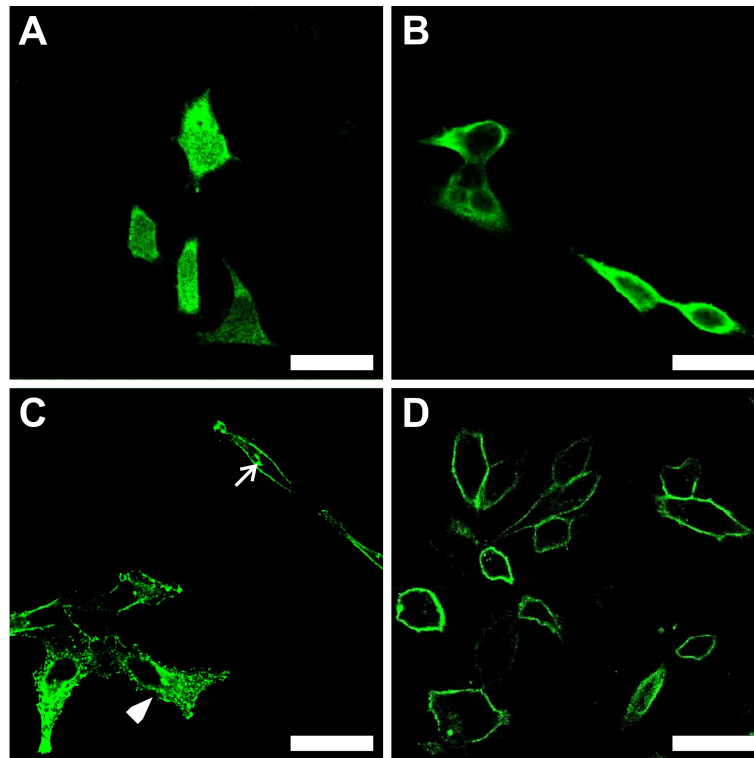


Abb. 3-6: Transiente Expression von GCaMP3.0-CaaX-Varianten und GAP43-28aa-GCaMP3.0 in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit (A) pscGCaMP3.0-CaaX (Bild aus Abb. 3-5A übernommen), (B) pscGCaMP3.0-10aa-CaaX (10 μ g), (C) pscGCaMP3.0-28aa-CaaX (10 μ g) oder (D) pscGAP43-28aa-GCaMP3.0 (10 μ g) transfiziert. Die Verteilung der Proteine wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Der Pfeil markiert ein intrazelluläres Aggregat. Der Pfeilkopf markiert eine Zelle, in der GCaMP3.0-28aa-CaaX zytoplasmatisch lokalisiert ist. Der eingezeichnete Balken entspricht 30 μ m.

Um Ca^{2+} Signale an bzw. in Mitochondrien messen zu können, wurde GCaMP3.0 so modifiziert, dass das Protein zum einen in die mitochondriale Matrix (mtGCaMP3.0) transportiert und zum anderen in der äußeren Mitochondrienmembran (mitochondrial outer membrane, momGCaMP3.0) verankert wurde.

Als Signalsequenz für die Translokation von GCaMP3.0 in die mitochondriale Matrix dienten die ersten 36 Aminosäuren der Cytochrom C Oxidase Untereinheit VIII (COX8, Rizzuto et al., 1995; Filippin et al., 2005). Die Sequenz wurde ohne Linker-Sequenz N-terminal an GCaMP3.0 angefügt. HEK293-Zellen wurden mit pscmtGCaMP3.0 transfiziert und die Verteilung des modifizierten Proteins in der Zelle fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Die mtGCaMP3.0-Fluoreszenz war nicht homogen in der Zelle verteilt. Vielmehr wurde ein tubuläres Netzwerk beobachtet (Abb. 3-7A).

Zur Lokalisierung von GCaMP3.0 in der mitochondrialen Außenmembran wurde sowohl die Transmembran-Anker- Sequenz (TMA) des Protoonkogens Bcl-2 (Nguyen et al., 1993) als

auch des mitochondrialen Transportproteins TOM20 (Kanaji et al., 2000) ohne Linker-Sequenz N-terminal angefügt. Die Fluoreszenzverteilung von TOM20-GCaMP3.0 (Abb. 3-7B) gleicht der Verteilung von mtGCaMP3.0. Das Verteilungsmuster von Bcl-2-GCaMP3.0 ist diffuser und es existieren „Aggregate“ in der Nähe des Zellkerns (Abb. 3-7C).

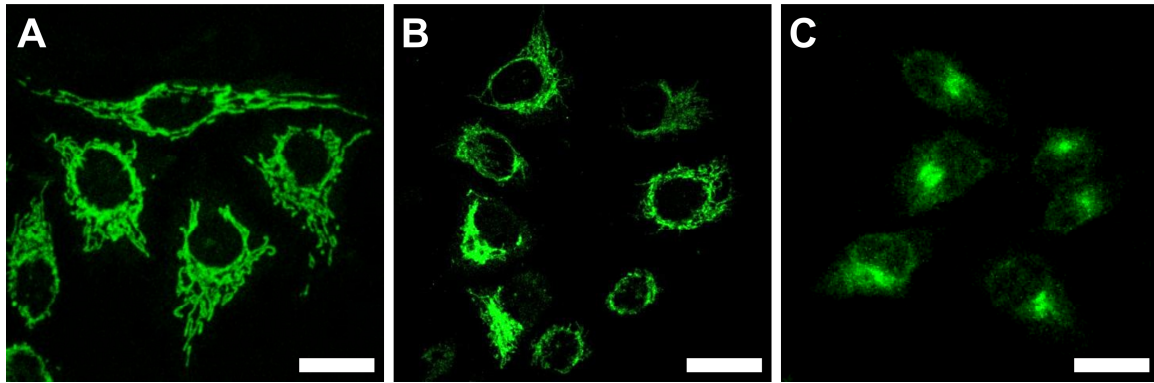


Abb. 3-7: Transiente Expression von GCaMP3.0-Varianten in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit (A) pscmtGCaMP3.0 (10 μ g), (B) pscTOM20-GCaMP3.0 (10 μ g) und (C) pscBcl-2-GCaMP3.0 (10 μ g) transfiziert. Die Verteilung der Proteine wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Der eingezeichnete Balken entspricht 20 μ m.

Das Verteilungsmuster von mt-, TOM20- und Bcl-2-GCaMP3.0 weicht deutlich von dem Verteilungsmuster der zytoplasmatischen Variante ab (Abb. 3-2B). Um zu überprüfen, ob die modifizierten GCaMP3.0 Varianten tatsächlich an den Mitochondrien oder einem anderen Organell lokalisiert sind, wurden Zellen mit den GCaMP3.0 Varianten und mit einem Golgi-TagRFP Fusionskonstrukt kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit einem Mitochondrien-spezifischen Farbstoff (MitoTracker Deep Red FM) beladen und fixiert. Anschließend wurde das ER mit einem spezifischen Antikörper gefärbt. Um auszuschließen, dass die Expression der GCaMP3.0-Varianten die Morphologie der untersuchten Organellen verändert, wurden HEK293-Zellen nur mit Golgi-TagRFP transfiziert und anschließend mit Mito-Tracker beladen, fixiert und gefärbt. Die Verteilung der GCaMP3.0-Varianten sowie der Organell-Marker wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb. 3-8). In HEK293-Zellen, die nur mit dem GolgiRFP-Konstrukt transfiziert wurden, ist der Golgi-Apparat gut zu erkennen (Abb. 3-8B1). Das ER wurde mit einem Antikörper gegen Calnexin angefärbt. Es ist in der Peripherie der Zellkerne zu erkennen (Abb. 3-8C1). Die Mitochondrien bilden ein kompaktes Netzwerk aus tubulären Strukturen (Abb. 3-8D1). Die Überlagerung der Bilder zeigt, dass die verschiedenen Organellen nicht kolokalisiert sind (Abb. 3-8E1).

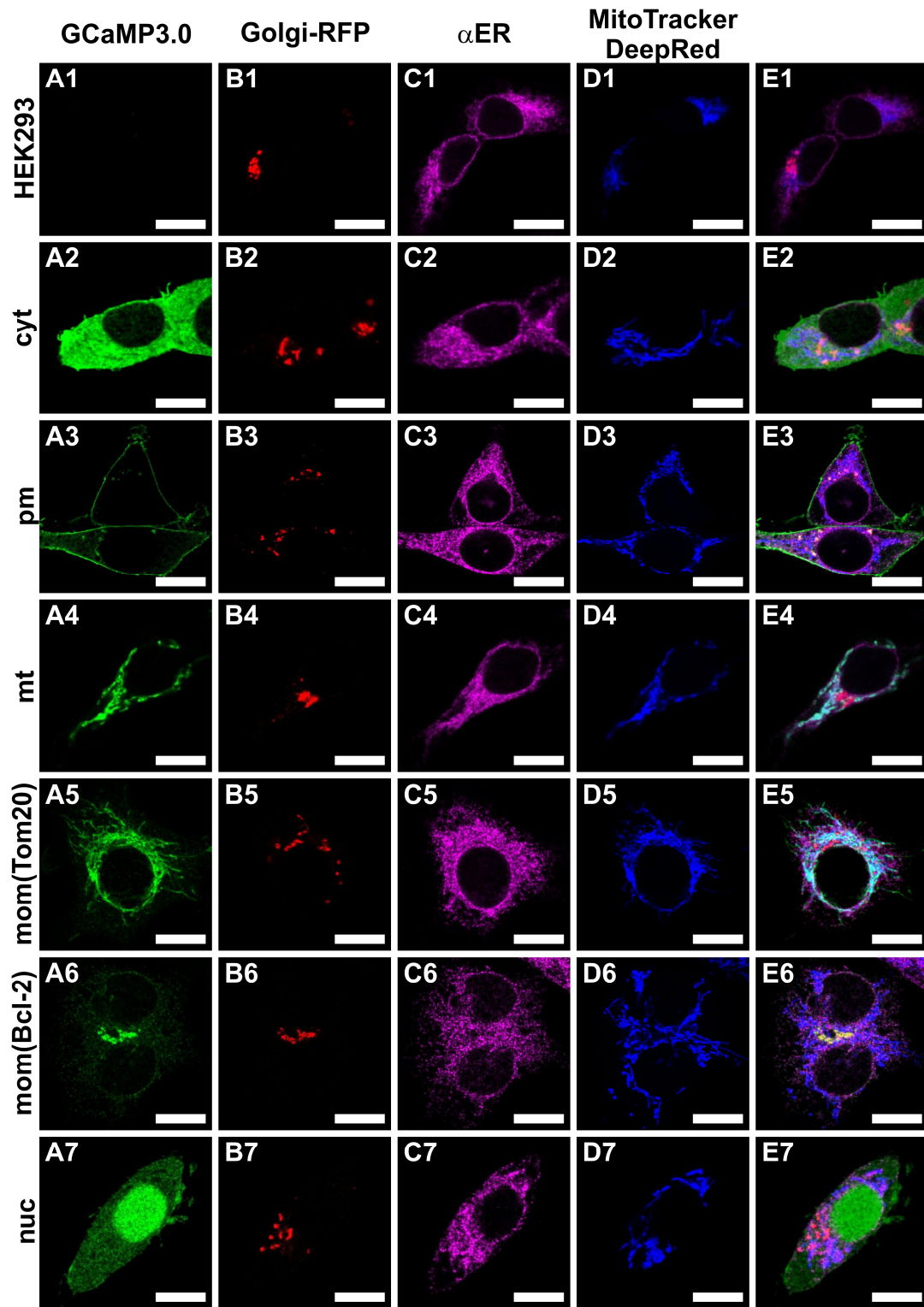


Abb. 3-8: Analyse der Verteilung transient exprimierter GCaMP3.0-Varianten. Um die Verteilung der modifizierten GCaMP3.0-Varianten in verschiedenen intrazellulären Kompartimenten zu analysieren, wurden HEK293-Zellen (A1) mit den GCaMP3.0-Varianten (A2-7) und Golgi-TagRFP transfiziert (B1-7). Das ER wurde mit einem Antikörper (rb α Calnexin, darbA594) angefärbt (C1-7). Mitochondrien wurden mit MitoTracker® Deep Red FM beladen (D1-7). Die Lokalisierung der GCaMP3.0-Varianten sowie der Organell-Marker wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert und die Einzelbilder überlagert, um Kollokalisierungen zu detektieren (E1-7). Der eingezeichnete Balken entspricht 8 μ m.

CytGCaMP3.0 ist, bis auf kleine Aussparungen, gleichmäßig im Zytosol verteilt, während der Zellkern weitgehend frei von Fluoreszenz ist (Abb. 3-8A2). Wie in der Kontrolle, ist der Golgi Apparat in der Nähe des Zellkerns zu erkennen (Abb. 3-8B2 und E2). Auch die Verteilung des ERs (Abb. 3-8C2) und der Mitochondrien (Abb. 3-8D2) gleicht dem Muster, das in Kontrollzellen detektiert wurde. Die Überlagerung der Bilder zeigt, dass die Aussparungen in der cytGCaMP3.0 Fluoreszenz von Mitochondrien gefüllt werden (Abb. 3-8E2).

In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen mit pmGCaMP3.0 transfiziert. Das Protein ist überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert. Kleine „Aggregate“ sind in der Nähe des Zellkerns zu erkennen (Abb. 3-8A3). Das Muster der intrazellulären pmGCaMP3.0-„Aggregate“ entspricht der Verteilung des Golgi-TagRFPs (Abb. 3-8B3), wie auch die Überlagerung der Bilder zeigt (Abb. 3-8E3). Die Verteilung von ER (Abb. 3-8C3) und Mitochondrien (Abb. 3-8D3) ähnelt dem Verteilungsmuster in nicht transfizierten HEK293-Zellen.

Auch durch die Expression der GCaMP3.0-Varianten, die an bzw. in die Mitochondrien gelenkt werden sollten (Abb. 3-8A4 - A6), ändern sich die subzelluläre Verteilung und die Morphologie des Golgi-Apparates (Abb. 3-8B4 – B6), des ERs (Abb. 3-8C4 – C6) und der Mitochondrien (Abb. 3-8D4 – D6) nicht. Sowohl die Fluoreszenzsignale von mtGCaMP3.0 (Abb. 3-8E4) als auch von Tom20-GCaMP3.0 (Abb. 3-8E5) sind mit den MitoTracker-Signalen kovertelt.

Bcl-2-GCaMP3.0 (Abb. 3-8A6) bildet kompakte Strukturen in der Nähe des Zellkerns. Darüber hinaus ist eine schwache Fluoreszenz im Zytoplasma zu erkennen. Die Überlagerung der GCaMP3.0 Fluoreszenz mit denen der Organellmarker zeigt, dass die kompakten Strukturen mit Golgi-TagRFP kolokalisieren (Abb. 3-8E6).

In meiner Masterarbeit wurde eine GCaMP3.0-Variante hergestellt, die im Zellkern lokalisiert ist (nucGCaMP3.0; Meisenberg, 2010). Diese Variante wurde ebenfalls gemeinsam mit Golgi-TagRFP exprimiert (Abb. 3-8A7). NucGCaMP3.0 ist hauptsächlich nukleär lokalisiert. Schwache Fluoreszenzsignale, die nicht mit den Organellen kolokalisieren (Abb. 3-8E7), sind im Zytosol zu erkennen. Die Morphologie und Verteilung der Organellen wird durch die Expression des Konstrukts nicht beeinträchtigt (Abb. 3-8B7 - D7).

Die Nukleotidsequenzen, der in dieser Arbeit charakterisierten GCaMP3.0 Varianten (vgl. 6.2) sowie eine Übersicht über die verwendeten Lokalisierungsmotive (Tab. 6-4) befinden sich im Anhang.

3.3 Spektroskopische Charakterisierung der GCaMP3.0 Varianten

Durch das Anfügen kurzer Signalsequenzen wurde GCaMP3.0 so modifiziert, dass das Sensorprotein in bzw. an verschiedene subzelluläre Kompartimente gelenkt wurde. Bevor die verschiedenen GCaMP3.0 Varianten in einem zellulären Modellsystem charakterisiert wurden, sollte *in vitro* der Einfluss der angefügten Peptide auf die Fluoreszenzeigenschaften des Sensors untersucht werden. Dazu wurden die GCaMP3.0 Varianten bakteriell exprimiert, aufgereinigt und spektroskopisch charakterisiert.

3.3.1 Expression und Reinigung der GCaMP3.0 Varianten

Die GCaMP3.0 Varianten wurden als poly-His-Tag Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und affinitätschromatographisch über eine Ni-NTA Matrix gereinigt. Aliquots aus jedem Schritt der Reinigung wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. In Abb. 3-9 ist exemplarisch die SDS-Gel Analyse einer Reinigung des nucGCaMP3.0 Proteins dargestellt.

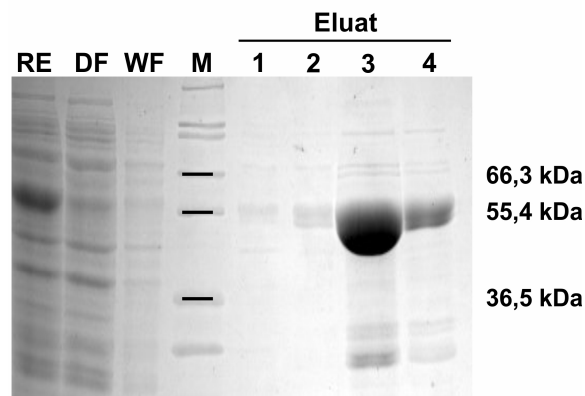


Abb. 3-9: SDS-Gel Analyse einer Reinigung der nucGCaMP3.0 Variante. Die GCaMP3.0 Varianten wurden in *E. coli* Zellen exprimiert und affinitätschromatographisch (Ni-NTA Säule) gereinigt. Jeweils 10 µl der einzelnen Fraktionen der Reinigung wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (SDS-PAGE). Die Größe einiger Markerproteine (kDa) ist angegeben. RE = Rohextrakt; DF = Durchfluss, WF = Waschfraktion, M = Marker

Der Rohextrakt (RE) der Expressionskultur enthielt eine stark angefärbte Proteinbande bei ~55 kDa. Das berechnete Molekulargewicht von nucGCaMP3.0 beträgt 51,6 kDa. Das experimentell beobachtete und das erwartete Molekulargewicht des Proteins stimmen im Rahmen der Messgenauigkeit mit dem Molekulargewicht der detektierten Bande gut überein. Das überexprimierte Protein band nahezu quantitativ an die Ni-NTA Matrix (Abb. 3-9, DF).

Die Matrix wurde vor der Elution der Proteine mit Puffer gewaschen. Die Waschfraktion enthielt kein Sensorprotein (Abb. 3-9, WF). Die spezifisch gebundenen GCaMP3.0 Proteine wurden in vier Fraktionen von der Säule eluiert. Aliquots der Eluate wurden ebenfalls gelelektrophoretisch analysiert (Abb. 3-9; Eluate 1-4). Das Eluat, das die größte Menge des Sensorproteins enthielt (hier Eluat 3), wurde für die *in vitro* Charakterisierung eingesetzt.

3.3.2 *In vitro* Charakterisierung der GCaMP3.0 Varianten

Zur Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften der modifizierten GCaMP3.0 Varianten wurden Fluoreszenzemissionsspektren der Sensorproteine bei unterschiedlichen $[Ca^{2+}]_{\text{frei}}$ aufgenommen und ausgewertet (Abb. 3-10). Die in Abb. 3-10A dargestellten Fluoreszenzspektren wurden mit nucGCaMP3.0 aufgenommen.

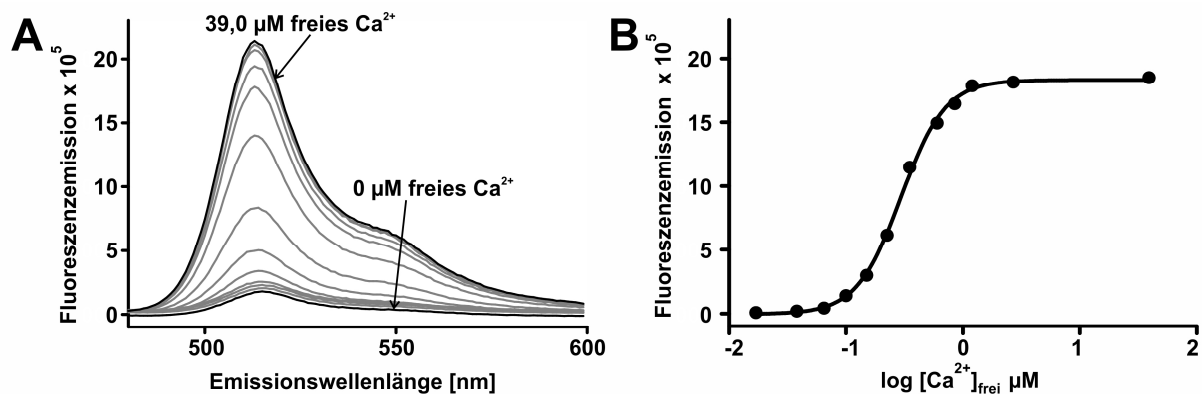


Abb. 3-10: *In vitro* Charakterisierung von nucGCaMP3.0. Das gereinigte nucGCaMP3.0 Protein wurde in Messpuffer verdünnt (2 μM Protein in 30 mM MOPS, 100 mM KCl mit 10 mM CaEGTA bzw. 10 mM K_2 EGTA; pH 7,2) und die $[Ca^{2+}]_{\text{frei}}$ der Lösung schrittweise erhöht. (A) Für jede $[Ca^{2+}]_{\text{frei}}$ wurde das Fluoreszenzemissionsspektrum von nucGCaMP3.0 bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm aufgezeichnet. Die Spektren, die bei 0 μM und 39 μM $[Ca^{2+}]_{\text{frei}}$ gemessen wurden, sind schwarz hervorgehoben. Die Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzintensität hatte ein Maximum bei 510 nm. (B) Die Fluoreszenzintensitäten bei 510 nm wurden gegen den Logarithmus der $[Ca^{2+}]_{\text{frei}}$ aufgetragen. Die dargestellte DW-Kurve wurde mit dem Programm Graphpad Prism 5.04 erstellt (nicht-lineare Regression, variable Steigung, 4 Parameter). Der EC_{50} für Ca^{2+} von nucGCaMP3.0 beträgt 297 nM.

Das gereinigte Protein wurde in Ca^{2+} -haltigem und -freiem Messpuffer auf 2 μM verdünnt und bei 470 nm angeregt. Die Emissionsspektren zeigten ein Fluoreszenzmaximum bei 510 nm. In Ca^{2+} -freiem Messpuffer war die Fluoreszenzemission bei 510 nm sehr niedrig. Durch schrittweise Zugabe von Ca^{2+} -haltigem Messpuffer wurde die freie Ca^{2+} Konzentration

der Lösung ($[Ca^{2+}]_{frei}$) in der Küvette erhöht. Die Zugabe von Ca^{2+} führte zu einem Anstieg der Fluoreszenzemission bei 510 nm. Die höchste Fluoreszenzemission wurde bei 39 μM $[Ca^{2+}]_{frei}$ im Messpuffer beobachtet. Die Spektren der anderen GCaMP3.0 Varianten, waren dem hier gezeigten Beispiel sehr ähnlich (s. Anhang Abb. 6-1).

Mit Hilfe der Emissionsspektren können wichtige Eigenschaften eines Ca^{2+} Sensors bestimmt werden. Die Auftragung der Fluoreszenzmaxima bei 510 nm gegen die $[Ca^{2+}]_{frei}$ ergibt eine Dosis-Wirkungs-Kurve (DW-Kurve, Abb. 3-10B), anhand der die Affinität des Sensors für Ca^{2+} berechnet werden kann. Für nucGCaMP3.0 wurde für die in Abb. 3-10A dargestellte Ca^{2+} Titration ein EC_{50} von 297 nM bestimmt.

Auf die gleiche Weise wurden die Ca^{2+} Affinitäten der GCaMP3.0 Varianten „cyt“, „nuc“, „pm“, „mt“ und „mom“ bestimmt (s. Anhang, Tab. 6-8). Mehrere aus unabhängigen Messungen berechnete Werte wurden für jede Variante gemittelt und sind in Tab. 3-1 dargestellt. Die Ca^{2+} Affinitäten der GCaMP3.0 Varianten unterscheiden sich statistisch nicht signifikant voneinander ($p=0,06$; „One Way ANOVA Test“, Graph Pad Prism 5.04).

Eine weitere Eigenschaft über die ein Ca^{2+} Indikator charakterisiert werden kann, ist der dynamische Bereich. Dieser ist ein Maß für die Sensitivität des Indikators. Um diesen Wert zu bestimmen setzt man die Fluoreszenzwerte bei der höchsten und der niedrigsten $[Ca^{2+}]_{frei}$ ins Verhältnis (Tab. 3-1).

Tab. 3-1: Vergleich der Eigenschaften von GCaMP3.0 Varianten

GCaMP3.0	n	EC_{50} [nM]	Dynamischer Bereich
cyt	10	234 ± 28	9 ± 2
nuc	4	286 ± 13	11 ± 1
pm	6	261 ± 63	10 ± 1
mt	5	264 ± 13	10 ± 2
mom	4	294 ± 41	11 ± 1

Für cytGCaMP3.0 ist das Maximalsignal neunfach höher als die Basalfluoreszenz. Auch für die modifizierten GCaMP3.0 Varianten wurde ein sehr ähnlicher dynamischer Bereich ermittelt.

Die *in vitro* Charakterisierung der GCaMP3.0 Varianten zeigte, dass die Modifikation der Primärstruktur der Sensorproteine deren Funktionalität nicht beeinflusst.

3.3.3 Einfluss des pH-Wertes auf die Fluoreszenzeigenschaften von mtGCaMP3.0

Im Gegensatz zum pH-Wert im Zytoplasma und im Zellkern können die pH-Werte in Organellen erheblich abweichen. So wurde für Mitochondrien in verschiedenen Zelllinien ein pH Wert von ca. 8,0 bestimmt (Llopis et al., 1998). Durch mtGCaMP3.0 sollen Änderungen der $[Ca^{2+}]$ in der mitochondrialen Matrix gemessen werden. Aus diesem Grund sollte der Einfluss eines alkalischen pH-Werts auf die Fluoreszenzeigenschaften von mtGCaMP3.0 ermittelt werden. Dazu wurden zusätzlich zu den Ca^{2+} Titrations des Proteins bei pH 7,2 (vgl. 3.3.2) Titrations bei pH 7,6 und pH 8,0 durchgeführt (jeweils $n=5$). Die Fluoreszenzspektren dienten als Grundlage für DW-Kurven zur Berechnung der Ca^{2+} Affinität von mtGCaMP3.0 bei den oben genannten pH-Bedingungen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind die in Abb. 3-11 dargestellten DW-Kurven auf die jeweils größte Fluoreszenzemission normiert. Die DW-Kurven, die dem physiologischen Bereich entsprechen (pH 7,2 und pH 7,6) sind sehr ähnlich, während die Kurve für pH 8,0 deutlich linksverschoben ist.

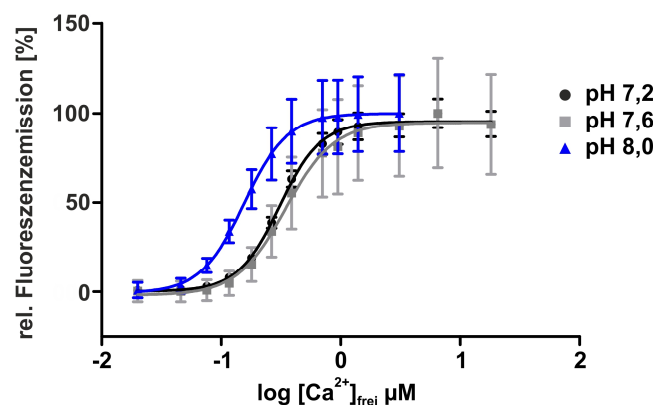


Abb. 3-11: Dosis-Wirkungs-Kurve für die Ca^{2+} Titration von mtGCaMP3.0 bei verschiedenen pH-Werten.

Die gereinigte mtGCaMP3.0 Variante wurde, wie in Abb. 3-10 beschrieben, zur Ca^{2+} Titration verwendet. Die Messpuffer unterschieden sich im pH-Wert: pH 7,2 (schwarz), pH 7,6 (grau) und pH 8,0 (blau). Die Fluoreszenzintensitäten bei 510 nm wurden für jeden pH-Wert auf die höchste Fluoreszenzintensität normiert. Die Mittelwerte (\pm SD) aus jeweils fünf unabhängigen Messungen wurden gegen den Logarithmus der $[Ca^{2+}]_{\text{frei}}$ [μ M] aufgetragen. Die dargestellten DW-Kurven wurden mit dem Programm Graphpad Prism 5.04 erstellt (nicht-lineare Regression, variable Steigung, 4 Parameter). Der EC_{50} für Ca^{2+} von mtGCaMP3.0 betrug bei pH 7,2: 264 ± 13 nM; bei pH 7,6: 326 ± 31 nM und bei pH 8,0: 151 ± 30 nM.

Dieses Ergebnis zeigt, dass bei höheren pH-Werten die Sättigung der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenz bereits bei niedrigen Ca^{2+} Konzentrationen erreicht wird.

3.4 Funktionelle Charakterisierung spezifisch lokalisierter GCaMP3.0 Varianten in HEK293-Zellen

3.4.1 HEK293-Zellen als Modellsystem zur Charakterisierung von GECIs

Die funktionellen Eigenschaften der mit Lokalisierungsmotiven modifizierten GCaMP3.0 Varianten wurden in HEK293-Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit den unterschiedlichen GCaMP3.0 Varianten transfiziert (hier: cytGCaMP3.0, Abb. 3-12). Die Zellen wurden über ein Perfusionssystem kontinuierlich mit Extrazellulärer Saline (ES) umspült. Es wurden geringe Fluoreszenzintensitäten detektiert, was auf eine niedrige $[Ca^{2+}]_i$ schließen lässt (Abb. 3-12A, links).

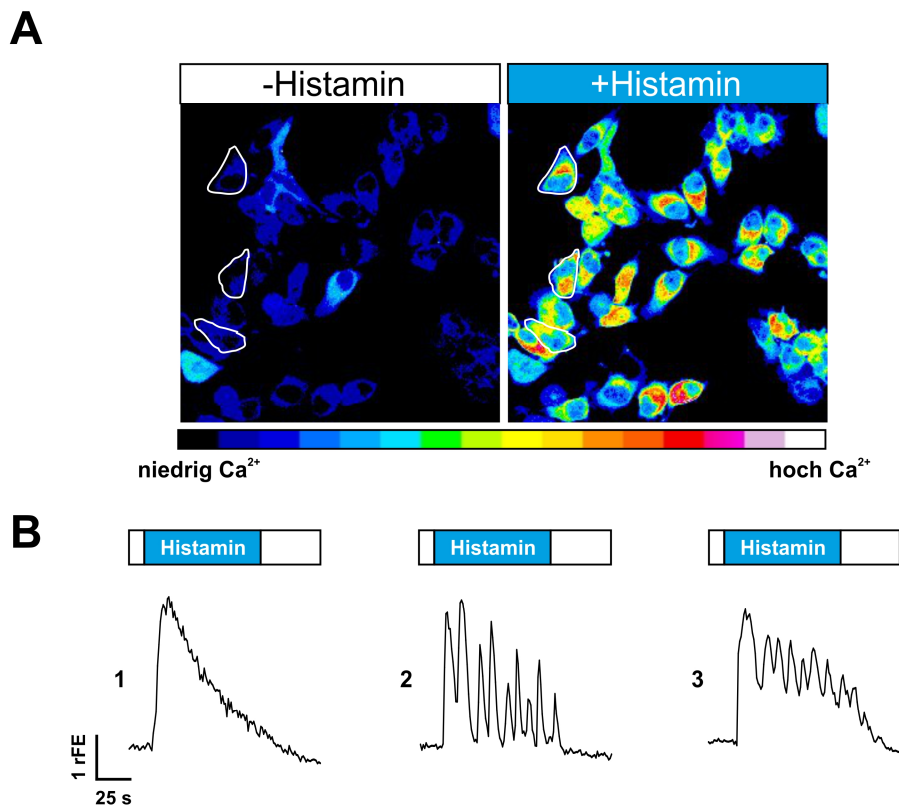


Abb. 3-12: Histamin induzierte Ca^{2+} Signale in HEK293-Zellen. (A) Mit cytGCaMP3.0 transfizierte HEK293-Zellen wurden abwechselnd mit ES (links) und ES-Histamin (rechts) umspült. In Anwesenheit von Histamin in der ES-Lösung steigt das Fluoreszenzsignal von cytGCaMP3.0, weil Histamin eine Signalkaskade aktiviert, die zu der Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern führt. Die relative $[Ca^{2+}]_i$ ist farbkodiert. Die Signalspuren der weiß markierten Zellen sind in (B) dargestellt. (B) Die Histamin-induzierte Änderung der cytGCaMP3.0-Fluoreszenz aus (A) konnte drei Antworttypen zugeordnet werden: (1) transiente Signale, (2) Oszillationen, (3) Oszillationen mit erhöhter Basalfluoreszenz. rFE = relative Fluoreszenzeinheiten; s = Sekunden, weiße Kästen = ES; blaue Kästen = ES-Histamin.

HEK293-Zellen reagieren auf die Zugabe von Histamin mit einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ (Vetter and Lewis, 2010). Wurde die Perfusionslösung durch histaminhaltige ES (10 μ M) ersetzt, stieg die Fluoreszenzintensität an (Abb. 3-12A, rechts). In Abb. 3-12B ist der zeitliche Verlauf der Histamin-abhängigen Änderung der cytGCaMP3.0 Fluoreszenz in einzelnen Zellen dargestellt. Analog zu der Stimulation von HEK293-DmOctaR1b-Zellen mit Octopamin (vgl. Abb. 3-1) konnten auch für die Stimulation mit Histamin drei Antworttypen unterschieden werden (Abb. 3-12B, 1-3): (1) transiente Signale, (2) Oszillationen und (3) Oszillationen mit erhöhter Basalfluoreszenz.

Mittels PCR wurde untersucht, ob die Histaminrezeptorgene h1 oder h3 (Yamashita et al., 1991, Lovenberg et al., 1999), welche für Histaminrezeptoren (HR) kodieren, die Ca^{2+} Signale auslösen, in HEK293-Zellen exprimiert sind. Dazu wurde mRNA in cDNA umgeschrieben und als Matrize für die PCR eingesetzt. Als Kontrollen dienten Ansätze, die mHRH1 oder mHRH3 kodierende Plasmide enthielten (s. Anhang, 6.3.1 für ein Sequenzalignment von mHrh1 und hHrh1 bzw. und 6.3.2 für mHrh3 und hHrh3). Der Nachweis erfolgte mit Rezeptor-spezifischen Primerpaaren, die jeweils ein kurzes Stück des Hrh1 oder Hrh3 Gens amplifizierten. Als Referenzgen diente β -Aktin. Die Amplifikationsprodukte wurden auf ein Agarosegel aufgetragen (Abb. 3-13A). Die PCR mit hrh1-spezifischen Primern lieferte ein Fragment der erwarteten Größe (144 bp) auf der cDNA aus HEK293-Zellen und dem mHRH1 kodierenden Plasmid, nicht aber auf dem HRH3 kodierenden Plasmid. Die hrh3 spezifischen Primer generierten ein Fragment der erwarteten Größe (481 bp) auf dem mHRH3 kodierenden Plasmid aber nicht auf der cDNA aus HEK293-Zellen oder dem mHRH1 kodierenden Plasmid (Abb. 3-13A). Das erwartete Fragment für β -Aktin hatte eine Größe von 554 bp (Abb. 3-13). Dieses Amplifikationsprodukt wurde ausschließlich in der cDNA nachgewiesen. Diese Experimente zeigen, dass in HEK293-Zellen das hrh1-Gen transkribiert wird, nicht aber das hrh3-Gen.

Der HRH1 gehört, wie alle Wirbeltier-Histamin-Rezeptoren, zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR, Claro et al., 1989; De Backer et al., 1998; Shimamura et al., 2011). Die Bindung von Histamin an HRH1 aktiviert eine Signalkaskade, die zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern führt (Jutel et al., 2006). Um zu überprüfen, ob die beobachteten Signale (s. Abb. 3-12) auf der Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern beruhen, wurden weitere Imaging-Experimente mit cytGCaMP3.0 exprimierenden HEK293-Zellen unter Ca^{2+} -freien Bedingungen durchgeführt.

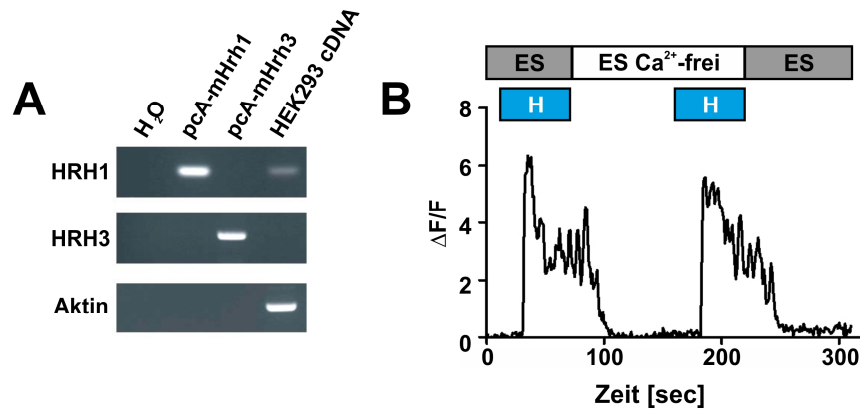


Abb. 3-13: Analyse der in HEK293-Zellen exprimierten Histaminrezeptorgene. (A) Aus HEK293-Zellen wurde mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und als Matrize für PCR Nachweise der Histaminrezeptorgene hrh1 und hrh3 verwendet. Als Positivkontrollen wurden pcDNA3-Expressionskonstrukte verwendet, die entweder den mHRH1 oder den mHRH3 kodierte. Als Referenzgen diente β -Aktin. Amplifikationsprodukte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. (B) HEK293-Zellen wurden mit cytGCaMP3.0 transfiziert. Die Zellen wurden mit Histamin (H, 10 μ M) in Ca^{2+} -haltigem ES stimuliert. Die Stimulation wurde über die Perfusion mit Ca^{2+} -freiem ES beendet. Die erneute Stimulation der Zellen mit 10 μ M Histamin erfolgte in Ca^{2+} -freier ES-Lösung. $\Delta F/F_0$ beschreibt Änderung der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenz relativ zur Basalfluoreszenz.

Die Zellen wurden zunächst mit Ca^{2+} -haltigem ES mit Histamin (10 μ M) stimuliert (Abb. 3-13B). Anschließend wurden die Zellen durch Umschalten der Perfusion mit Ca^{2+} -freiem ES umspült und danach mit Histamin (10 μ M) in Ca^{2+} -freiem ES erneut stimuliert. In Abb. 3-13B ist eine dieser Kontrollmessungen dargestellt. Während der Stimulation mit ES-Histamin wurde eine Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ detektiert. Beim Umspülen der Zellen mit Ca^{2+} -freiem ES für 90 s ging das Fluoreszenzsignal auf das Ausgangsniveau zurück. Die nachfolgende Stimulation mit Histamin in Ca^{2+} -freiem ES führte zu einer vergleichbaren Ca^{2+} -Antwort wie bei der ersten Ligandenzugabe in Ca^{2+} -haltigem ES. Das Experiment zeigt, dass die Änderung der GCaMP3.0 Fluoreszenz auf der Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} beruht und nicht auf dem Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} in die Zelle.

3.4.2 Herstellung stabil transfizierter GCaMP3.0 Zelllinien

Für die GCaMP3.0 Varianten „cyt“, „nuc“, „pm“, „mt“ und „mom“ wurden mehrere, stabil transfizierte HEK293-Zelllinien hergestellt. Dazu wurden die verschiedenen GCaMP3.0-Gene in den Vektor pcDNATM6/myc-His A kloniert, da der Ursprungsvektor pscCMV keine Selektions-Resistenz vermittelt. Die Herstellung stabiler Zelllinien erfolgte wie in 2.7.1.6 beschrieben.

Die Expression der Sensorproteine in den HEK293-Zellklonen wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Mehrere Zellklone, die die GCaMP3.0 Varianten homogen exprimierten, wurden hinsichtlich der subzellulären Verteilung und Expressionsstärke des Sensors unter Imaging-Bedingungen am 2-Photonen-Mikroskop untersucht.

Die subzelluläre Verteilung der GCaMP3.0 Varianten wurde in ausgewählten Zellklonen mit Hilfe von „Line-Scan“ Analysen bestimmt (pro Zelllinie $n = 50$). Wie in Abb. 3-14 (linke Spalte) dargestellt, wurden „*regions of interest*“ (ROI) entlang der eingezeichneten Linien in einzelnen Zellen definiert. Die Gesamtlänge einer Linie entsprach $40\text{ }\mu\text{m}$, wobei die jeweils ersten und letzten $10\text{ }\mu\text{m}$ außerhalb der Zelle lagen. Die entlang der Linie gemessene relative Fluoreszenzintensität wurde gegen die Distanz aufgetragen (Abb. 3-14, rechte Spalte).

Fluoreszenzsignale von cytGCaMP3.0 sind nur innerhalb der Zelle zu erkennen (Abb. 3-14A). Dabei steigt die Fluoreszenz entlang der ROI-Linie mit Eintritt in die Zelle stark an. Die Intensität des Fluoreszenzsignals fällt im Bereich des Zellkerns (Abschnitt zwischen 13 und $25\text{ }\mu\text{m}$) auf einen Wert von 11% und steigt anschließend (Abschnitt zwischen 25 und $30\text{ }\mu\text{m}$) erneut stark an. Nach dem Verlassen der Zelle ist, wie bereits vor dem Eintritt in die Zelle, kein Fluoreszenzsignal zu detektieren (Abb. 3-14A, rechts). Die Bereiche mit hohen Fluoreszenzintensitäten entsprechen dem Zytosol.

Das Fluoreszenzsignal der nukleär lokalisierten GCaMP3.0 Variante (nucGCaMP3.0#15, Abb. 3-14B, linke Spalte) ist nahezu komplementär zum Profil der zytoplasmatischen Variante. Die Fluoreszenzintensität ist im Bereich des Zellkerns (Abschnitt zwischen 15 und $27\text{ }\mu\text{m}$) sehr hoch. Im Zytosol wurden nur sehr niedrige Fluoreszenzintensitäten gemessen (Abb. 3-14B, rechte Spalte).

Die Verteilung des Fluoreszenzsignals von pmGCaMP3.0#6 (Abb. 3-14C, linke Spalte) unterscheidet sich nochmals von den zuvor beschriebenen Varianten (vgl. Abb. 3-14A und B). Die Bereiche maximaler Fluoreszenzintensität sind deutlich schmaler ($8\text{--}12\text{ }\mu\text{m}$ und $24\text{--}28\text{ }\mu\text{m}$) als in Zellen, in denen die zytoplasmatische oder die nukleäre Variante exprimiert wurden. Zwischen den fluoreszierenden Abschnitten der pmGCaMP3.0 exprimierenden Zellen liegt der Bereich, der dem Zytosol ($12\text{--}18\text{ }\mu\text{m}$) und dem Zellkern ($18\text{--}24\text{ }\mu\text{m}$) entspricht. Hier wurden sehr niedrige Fluoreszenzintensitäten beobachtet (Abb. 3-14C, rechts).

Die Fluoreszenzintensitätsprofile der mitochondrialen GCaMP3.0 Varianten (Abb. 3-14D und E) weisen mehrere Maxima mit unterschiedlichen Signalstärken auf. Die Fluoreszenzsignale befinden sich fast ausschließlich in den Bereichen, die dem Zytosol entsprechen. In der markierten Zelle (Abb. 3-14D) sind wenige, deutlich schwächere Signale auch im Bereich

des Zellkerns zu erkennen. Die Fluoreszenzsignale bestätigen die tubuläre Verteilung der mitochondrialen GCaMP3.0 Konstrukte (s.a. Abb. 3-7).

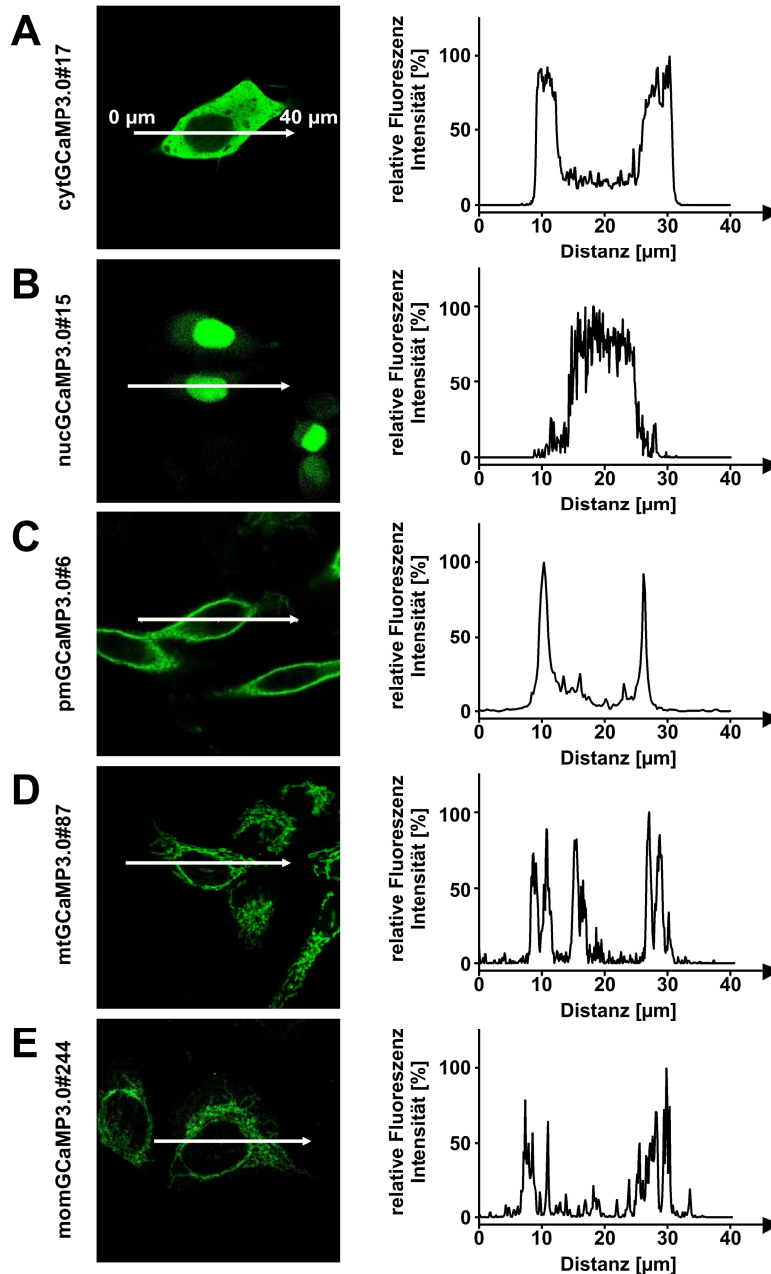


Abb. 3-14: Subzelluläre Verteilung der GCaMP3.0 Varianten in stabil transfizierten HEK293-Zellen. Die subzelluläre Verteilung der GCaMP3.0 Varianten in ausgewählten Zellklonen wurde durch „Line-Scan“ Analysen bestimmt. Dazu wurden ROI entlang einer Linie in konfokalen Aufnahmen einzelner Zellen der GCaMP3.0-HEK293 Zellklone (A-E, linke Spalte, n = 50) definiert. Die Gesamtlänge jeder Linie betrug 40 μm . Die jeweils ersten und letzten 10 μm wurden außerhalb der Zelle gelegt. Die entlang der Linie gemessene relative Fluoreszenzintensität wurde gegen die Länge aufgetragen (rechte Spalte).

Die beschriebenen Fluoreszenzintensitätsprofile der GCaMP3.0 Varianten waren in allen Zellen eines Zellklons sehr reproduzierbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass die subzelluläre Verteilung der Sensorproteine auch bei konstitutiver Expression sehr zuverlässig ist.

Die Zelllinien, deren subzelluläre Verteilung des Sensorproteins der Erwartung entsprach, wurden hinsichtlich der Sensorexpressionsstärke analysiert. Diese sollte so hoch sein, dass die Basalfluoreszenz bei geringer Laserintensität und niedriger $[Ca^{2+}]$ leicht zu detektieren ist (Abb. 3-15A, oben). Gleichzeitig sollten die stabilen GCaMP3.0-HEK293-Linien auch einen großen dynamischen Bereich aufweisen, d.h. die durch eine Änderung der $[Ca^{2+}]$ bedingte Zunahme der Fluoreszenz sollte möglichst groß sein (Abb. 3-15, unten).

Zur Charakterisierung der GCaMP3.0 Varianten wurden die Zellklone cytGCaMP3.0#17, nucGCaMP3.0#15, pmGCaMP3.0#6 und mtGCaMP3.0#87 gewählt. In diesen Zelllinien konnte bei gleich großer Laserintensität auch bei niedriger $[Ca^{2+}]_i$ eine ausreichende Basalfluoreszenz detektiert werden (Abb. 3-15, obere Reihe). Bei momGCaMP3.0#244 war eine ca. 10-20fach höhere Laserintensität nötig, um positive Zellen zu identifizieren. Die Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenz aller GCaMP3.0 Varianten stieg nach Stimulation mit 10 μ M Histamin (Abb. 3-15, untere Reihe) reproduzierbar an.

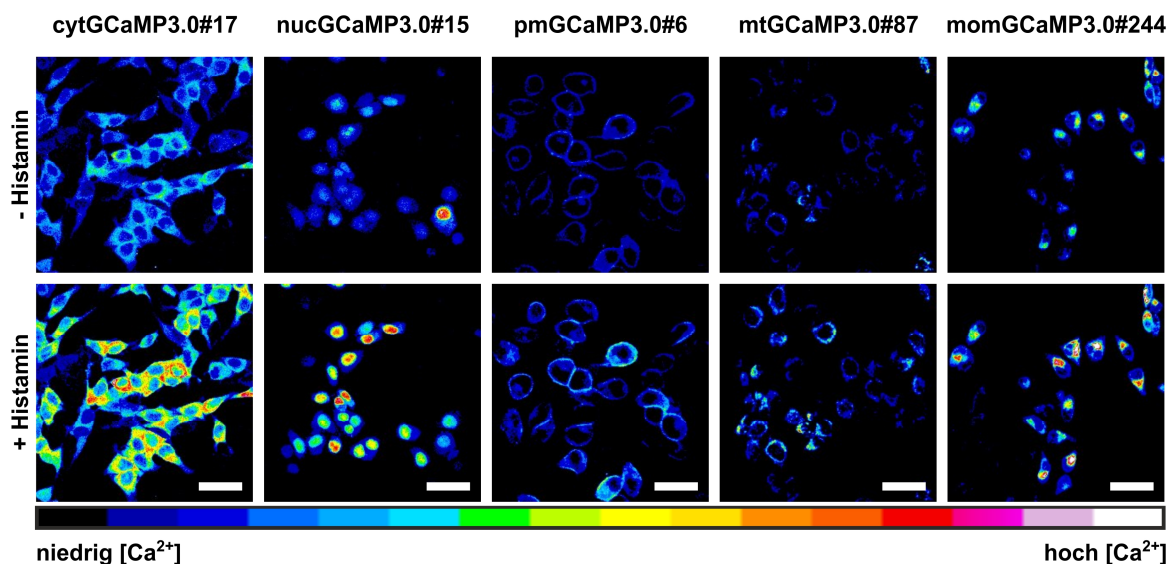


Abb. 3-15: Stabil transfizierte GCaMP3.0-HEK293-Zelllinien. HEK293-Zellen wurden mit pcDNATM6/myc-His A Expressionskonstrukten stabil transfiziert. Positive Zellklone wurden fluoreszenzmikroskopisch identifiziert. Für jede GCaMP3.0-Variante wurde anhand der Homogenität und Stärke der Basalfluoreszenz des Proteins ein Zellklon zur weiteren Analyse ausgewählt (obere Reihe). Die Zellklone cytGCaMP3.0#17, nucGCaMP3.0#15, pmGCaMP3.0#6, mtGCaMP3.0#87 und momGCaMP3.0#244 wurden mit Histamin stimuliert. Sie reagierten mit einer Erhöhung der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzintensität (untere Reihe). Der eingezeichnete Balken entspricht 30 μ m. Die relative $[Ca^{2+}]$ ist farbkodiert.

Um den EC_{50} für Histamin zu ermitteln wurden Ca^{2+} -fluorimetrische Messungen auf Mehrzellniveau wie in 2.11 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden Zellen verwendet, die entweder mit Fluo-4 beladen worden waren oder konstitutiv cytGCaMP3.0 bzw. nucGCaMP3.0 exprimierten. Die DW-Kurven sind in Abb. 3-16 dargestellt. Eine Erhöhung der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenz wurde sowohl mit Fluo-4 als auch mit den beiden GCaMP3.0 Varianten bereits bei der Inkubation mit 0,03 μM Histamin detektiert. Inkubationen mit 100 μM Histamin führten bei Fluo-4 und cytGCaMP3.0 exprimierenden Zellen zur Sättigung des Ca^{2+} induzierten Fluoreszenzsignals. Bei nucGCaMP3.0 exprimierenden Zellen sättigte das Signal bei 300 μM Histamin. Die Verläufe der DW-Kurven sind sehr ähnlich. Auch die anhand der DW-Kurven bestimmten EC_{50} -Werte für Histamin waren sehr ähnlich mit 1,2 μM (Fluo-4), 1,1 μM (cytGCaMP3.0) und 2,7 μM (nucGCaMP3.0).

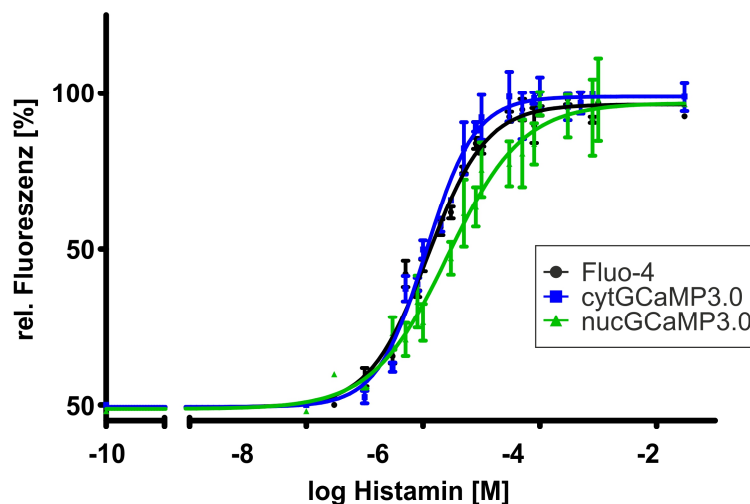


Abb. 3-16: Dosis-Wirkungs-Kurven der Histamin-abhängigen Ca^{2+} Signale in HEK293-Zellen. Die fluorimetrische Messung der relativen $[Ca^{2+}]$ wurde in 96er-Multiwellplatten im FluoStar Galaxy, BMG durchgeführt. Es wurden HEK293-Zellen verwendet, die entweder mit Fluo-4 beladen worden waren oder cytGCaMP3.0 bzw. nucGCaMP3.0 konstitutiv exprimierten. Die Änderung des Histamin induzierten Ca^{2+} Signals wurde als Anstieg des Fluoreszenzsignals gemessen. Für die Erstellung der DW-Kurven wurden die Fluoreszenzsignale auf den höchsten Fluoreszenzwert normiert. Die normierten Messwerte ($\pm SD$) jedes vierfach bestimmten Messpunktes wurden gegen den Logarithmus der Histaminkonzentration [M] aufgetragen. Die dargestellten DW-Kurven wurden mit dem Programm Graphpad Prism 5.04 erstellt (nicht-lineare Regression, variable Steigung, 4 Parameter). Der EC_{50} für Histamin betrug: Fluo-4, $1,2 \pm 0,1 \mu M$; cytGCaMP3.0, $1,1 \pm 0,1 \mu M$; nucGCaMP3.0 $2,7 \pm 1,3 \mu M$.

3.4.3 Messung der $[Ca^{2+}]_i$ mit verschiedenen GCaMP3.0 Varianten

Wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben wurde GCaMP3.0 durch das Anfügen kurzer Signalsequenzen so modifiziert, dass das Protein in bzw. an verschiedenen subzellulären Kompartimenten lokalisiert ist. Diese Varianten sollten die Messung lokaler Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ ermöglichen. Die Funktionalität der subzellulär unterschiedlich lokalisierten GCaMP3.0 Varianten wurde in den verschiedenen HEK293-Zelllinien untersucht.

Die Zellklone wurden mit 10 μ M Histamin stimuliert, um eine Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ zu induzieren.

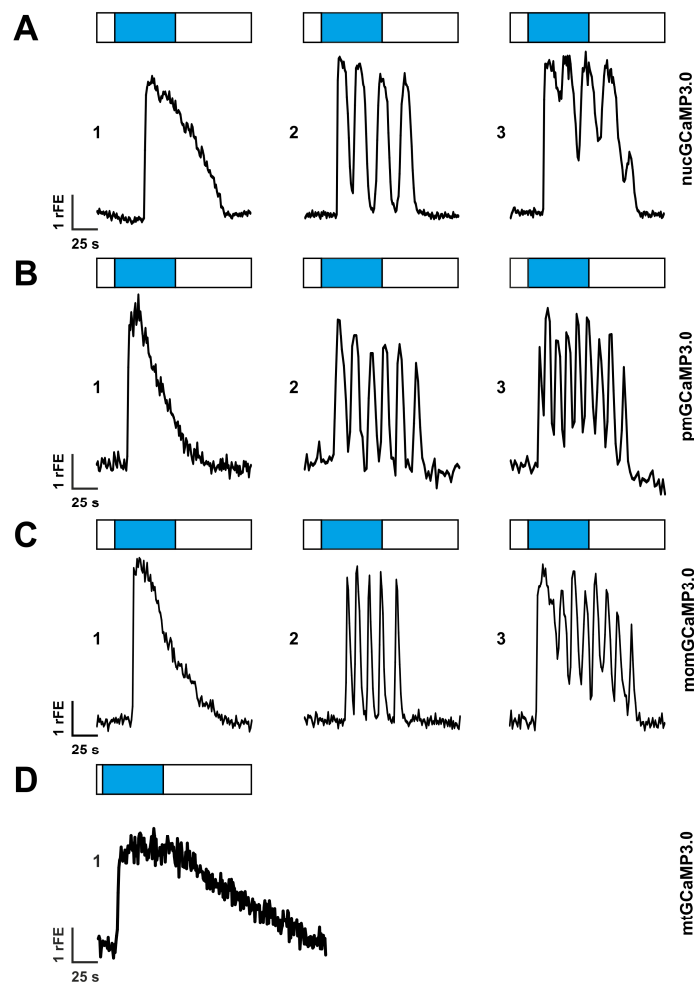


Abb. 3-17: Histamin induzierte Ca^{2+} Signale in GCaMP3.0 exprimierenden HEK293-Zellen. Zellen der stabil mit (A) nucGCaMP3.0, (B) pmGCaMP3.0, (C) momGCaMP3.0 oder (D) mtGCaMP3.0 transfizierten HEK293-Zelllinien wurden abwechselnd mit ES (weiße Kästen) und ES-Histamin (blauer Kasten) umspült. In Anwesenheit von 10 μ M Histamin stieg das Fluoreszenzsignal von GCaMP3.0 an. Die Histamin induzierte Änderung der GCaMP3.0-Fluoreszenz konnte drei Antworttypen zugeordnet werden: (1) transiente Signale, (2) Oszillationen, (3) Oszillationen mit erhöhter Basalfluoreszenz; rFE = relative Fluoreszenzeinheiten; s = Sekunden.

Wie bereits für cytGCaMP3.0 beschrieben (vgl. Abb. 3-12), wurden auch mit nucGCaMP3.0 (Abb. 3-17A) und pmGCaMP3.0 (Abb. 3-17B) unterschiedliche Antworten beobachtet: (1) transiente Signale, (2) Oszillationen und (3) Oszillationen mit erhöhter Basalfluoreszenz. Während mit momGCaMP3.0 auch Signale gemessen wurden, die den bereits beschriebenen Formen (1) - (3) zugeordnet werden können (vgl. Abb. 3-1C), wurden mit mtGCaMP3.0 ausschließlich transiente Signale gemessen (Abb. 3-17D). Im Gegensatz zu den transienten Signalen, die mit den GCaMP3.0 Varianten cyt, pm und mom beobachtet wurden, erreichten die Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzsignale von mtGCaMP3.0 nicht unmittelbar nach Ende der Stimulation sondern erst nach ca. 100 s wieder das Ausgangsniveau.

Mitochondrien erfüllen eine Ca^{2+} Pufferfunktion. Bei großen Konzentrationsänderungen im Zytoplasma kann Ca^{2+} von Mitochondrien aufgenommen werden. Der Export aus dem Organell erfolgt jedoch zeitverzögert. Daher würde man für mtGCaMP3.0 den oben beschriebenen Signalverlauf erwarten.

Um die Orientierung der mitochondrialen Sensor Varianten unabhängig zu überprüfen, wurden Experimente mit Carbonylcyanid-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon (FCCP) durchgeführt. FCCP ist ein synthetischer Entkoppler der Atmungskette. Er erhöht die Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran für Protonen, sodass das Membranpotential positiver wird. Dadurch wird der Einstrom von Ca^{2+} in die Mitochondrien gemindert. In Abb. 3-18 ist die Ca^{2+} -abhängige Änderung der Fluoreszenz der mitochondrialen GCaMP3.0 Varianten in Ab- und Anwesenheit von FCCP dargestellt.

Während der Stimulation von mtGCaMP3.0 exprimierenden Zellen mit 10 μM Histamin stieg das Fluoreszenzsignal des Sensors an (Abb. 3-18A). Das Auswaschen des Liganden mit ES führte, wie schon in Abb. 3-17D gezeigt, zu einem langsamen Abfall des Fluoreszenzsignals bis auf das Basalniveau. Nach 290 s wurde die Perfusion auf ES mit 10 μM FCCP umgestellt. Dies bewirkte einen Abfall der Fluoreszenzintensität. Weitere 30 s später wurden die Zellen mit 10 μM Histamin in Anwesenheit von 10 μM FCCP stimuliert. Die Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzintensität stieg an, jedoch deutlich weniger als in Abwesenheit von FCCP. Die Zellen wurden anschließend mit Histamin- und FCCP-freiem ES umspült. Schließlich wurden Zellen erneut mit Histamin stimuliert. Das Fluoreszenzsignal erreichte die gleiche Intensität, wie bei der ersten Histamin-Applikation. Bei Experimenten mit Zellen, die konstitutiv momGCaMP3.0 exprimierten, wurde keine FCCP-abhängige Abnahme sondern eher ein geringer Anstieg der Fluoreszenzintensität des Sensors beobachtet (Abb. 3-18B).

Diese Experimente zeigen, dass mtGCaMP3.0 tatsächlich in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist, in der sich der Einfluss von FCCP direkt auf die Ca^{2+} Homöostase auswirkt.

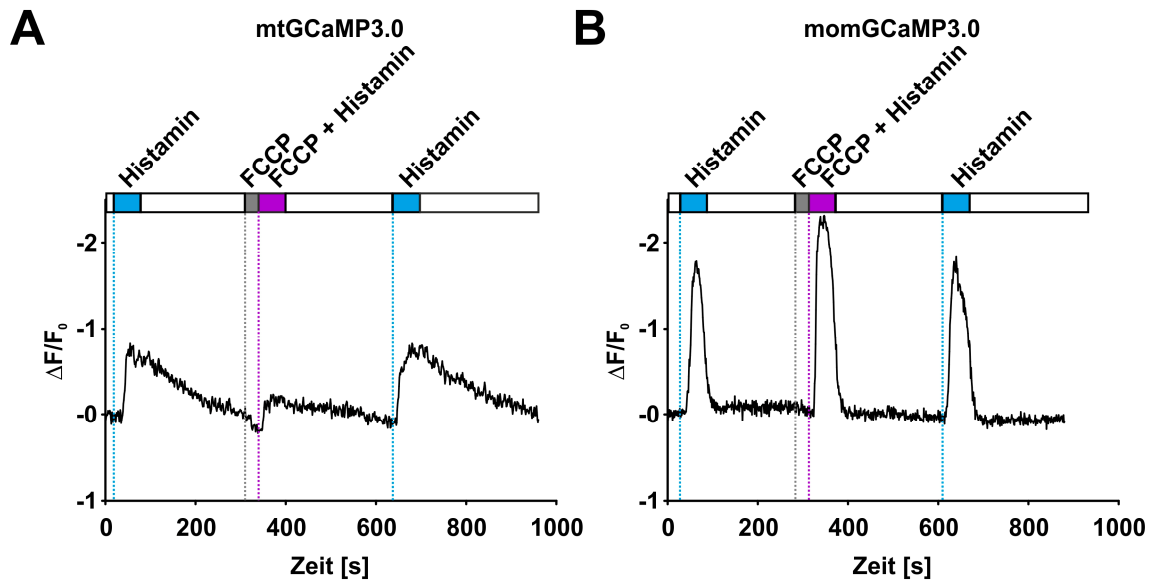


Abb. 3-18: Funktionelle Analyse von mtGCaMP3.0 und momGCaMP3.0 in den Mitochondrien. Zellen die konstitutiv (A) mtGCaMP3.0 oder (B) momGCaMP3.0 exprimierten wurden in Abwesenheit (hellblaue Kästen) oder Anwesenheit von 10 μM FCCP (lila Kästen) mit Histamin (10 μM) stimuliert. Vor der gemeinsamen Applikation erfolgte eine Präinkubation der Zellen mit FCCP (grauer) Kästen. Das Auswaschen der Liganden erfolgte mit ES (weiße Kästen). Die Ca^{2+} -abhängige Änderung des Fluoreszenzsignals ist dargestellt. Die gestrichelte Linie markiert den Beginn der Stimulation. $\Delta F/F_0$ = Änderung der Fluoreszenzintensität im Verhältnis zur Basalfluoreszenz; s = Sekunden; FCCP = Carbonylcyanid-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazon

Zur weiteren Charakterisierung der beiden mitochondrial lokalisierten GCaMP3.0 Varianten wurden Zellen der jeweiligen Zelllinie (s. 3.4.2) zusätzlich mit Fura-2 beladen und mit Histamin in ansteigenden Konzentrationen stimuliert. Dabei wurden Histaminkonzentrationen gewählt, die den dynamischen Bereich der DW-Kurve abdecken (vgl. Abb. 3-16). Vor der ersten Stimulation und nach allen weiteren Stimulationen wurden die Zellen mit ES-Lösung ohne Histamin umspült, um den Liganden auszuwaschen.

In Abb. 3-19 sind Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzintensitäten dargestellt, die während einer solchen Stimulationsreihe in Fura-2 beladenen Zellen gemessen wurden, die entweder momGCaMP3.0 oder mtGCaMP3.0 exprimierten.

Die Stimulation mit Histamin führte zu Änderungen der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzsignale der GCaMP3.0 Varianten und von Fura-2. Die Signale unterschieden sich jedoch hinsichtlich der Form und Dauer sowie in ihrer Konzentrationsabhängigkeit. In momGCaMP3.0 exprimierenden Zellen erhöhte sich die Sensorfluoreszenz transient bereits nach Stimulation mit 0,5 μM Histamin. Höhere Histaminkonzentrationen bewirkten Ca^{2+} Oszillationen (Abb. 3-19A). Mit Fura-2, das auf die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]$ mit einer Abnahme des Fluoreszenzsignals bei 760 nm (2-Photonen-Anregung) reagiert, wurden Signale erst bei

Konzentrationen von 1 μM , 10 μM und 100 μM detektiert. Die Signalformen und Verläufe waren denen von momGCaMP3.0 jedoch sehr ähnlich (Abb. 3-19A).

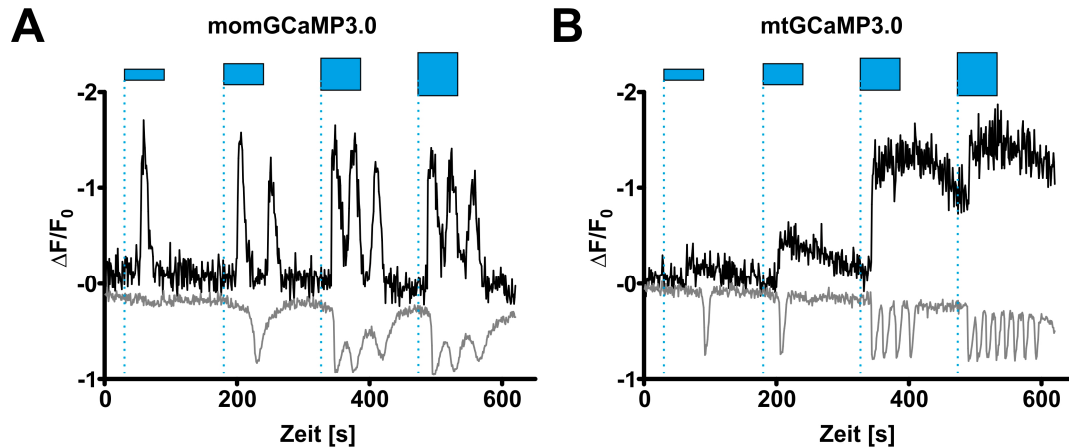


Abb. 3-19: Analyse von Histamin induzierten Ca^{2+} Signalen mit Fura-2 und mitochondrial lokalisierten GCaMP3.0 Varianten. HEK293-Zellen, die mit Fura-2 beladen waren und auch konstitutiv (A) momGCaMP3.0 oder (B) mtGCaMP3.0 exprimierten, wurden mit Histamin in steigenden Konzentrationen stimuliert. Die Änderungen der Fluoreszenzintensität (ΔF) wurden gegen die Basalfluoreszenz (F_0) normalisiert und zeitabhängig dargestellt. Während der Messung wurde die Perfusionslösung jeweils für 60 s (blaue Kästen) auf 0,5 μM , 1 μM , 10 μM oder 100 μM Histamin umgestellt. Nach jeder Liganden-Applikation wurden die Zellen für 90 s mit ES-Lösung ohne Ligand umspült.

Mit mtGCaMP3.0 wurden für alle Histaminkonzentrationen transiente Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]$ beobachtet (Abb. 3-19B). Nach der Stimulation mit 0,5 μM und 1 μM Histamin kehrte die Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenz auf das Basalniveau zurück. Unter diesen Bedingungen wurden mit Fura-2 einzelne transiente Signale beobachtet. Im Gegensatz dazu führten Inkubationen mit 10 μM und 100 μM Histamin zu Ca^{2+} Oszillationen, die mit Fura-2 registriert wurden. Mit dem mtGCaMP3.0 Sensor wurden weiterhin transiente Signale gemessen, die jedoch eine höhere Signalintensität erreichten und während der Auswaschphase nicht mehr auf das Basalniveau zurückgingen.

Für jede Histaminkonzentration wurde die Zeit bestimmt, die zwischen dem Beginn der Ligandenzugabe und dem Einsetzen des Fluoreszenzsignals lag (Abb. 3-20). Als Beginn des Signals wurde der Zeitpunkt definiert, an dem die auf die Basal- und Hintergrundfluoreszenz normierte Fluoreszenzintensität einen Schwellenwert zum ersten Mal überschritt (2.12.3). Als Kontrollen wurden die Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzsignale in Zellen ausgewertet, die

entweder nur mit Fura-2 beladen worden waren oder konstitutiv eine der mitochondrialen GCaMP3.0 Varianten exprimierten.

Der Farbstoff Fura-2 ist homogen in der Zelle verteilt und ermöglicht somit vor allem die Detektion von Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ im Bereich des Zytoplasmas. Wurden Fura-2 beladene HEK293-Zellen mit niedrigen Histaminkonzentrationen (0,1 μ M, 0,5 μ M oder 1 μ M Histamin) stimuliert, dauerte es zwischen 31 ± 5 s (0,1 μ M, n = 27) und 33 ± 7 s (0,5 μ M, n = 49, bzw. 1 μ M, n = 83) bis ein Signal detektiert werden konnte. Höhere Histaminkonzentrationen führten zu einer schnelleren Signaldetektion: 24 ± 4 s (10 μ M; n = 104) und 16 ± 3 s (100 μ M; n = 104) (Abb. 3-20A und B, hellgraue Balken).

Die Änderung des Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzsignals des momGCaMP3.0 Sensors setzte bei niedrigen Histaminkonzentrationen nach 45 ± 10 s (0,1 μ M; n = 10), 37 ± 10 s (0,5 μ M, n = 48) und 36 ± 6 s (1 μ M; n = 62) ein. Das durch 10 μ M bzw. 100 μ M Histamin ausgelöste Ca^{2+} Signal wurde nach 27 ± 5 s bzw. 20 ± 4 s (beide n = 86) detektiert (Abb. 3-20A).

Interessanterweise wurde in Zellen, die das momGCaMP3.0 Sensorprotein exprimierten und gleichzeitig mit Fura-2 beladen waren, deutliche Unterschiede in der Fura-2 Signaldetektion beobachtet. Mit den niedrigsten Histaminkonzentrationen (0,1 μ M; 0,5 μ M) wurden keine Fura-2 Signale detektiert.

Bei höheren Histaminkonzentrationen war die Zeitdauer bis zum Beginn des Fura-2 Signals signifikant verlängert: bei 1 μ M Histamin von 33 auf 44 ± 5 s (n = 10, $p < 0,0001$), bei 10 μ M von 24 auf 28 ± 5 s (n = 25; $p = 0,0008$) und bei 100 μ M von 16 auf 23 ± 6 s (n = 26, $p < 0,0001$) (Abb. 3-20A). Im Gegensatz zu den Effekten, die für Fura-2 beobachtet wurden, wurden die Signalantworten des Sensorproteins durch die Anwesenheit von Fura-2 nicht beeinflusst.

In Zellen, die mtGCaMP3.0 exprimierten, aber nicht mit Fura-2 beladen worden waren, wurden Histamin induzierte Signale vergleichbar schnell detektiert, wie in momGCaMP3.0 Zellen (Abb. 3-20B). Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$, die durch niedrige Ligandenkonzentrationen induziert wurden, wurden auch von mtGCaMP3.0 später detektiert als $[Ca^{2+}]$ Änderungen nach Zugabe höherer Ligandenkonzentrationen. Die Anwesenheit von Fura-2 beeinflusste das Signalverhalten des Sensorproteins deutlich. Bei der niedrigsten Histaminkonzentration wurde kein mtGCaMP3.0 Fluoreszenzsignal mehr registriert (Abb. 3-20B, dunkelgraue Balken). Die Detektion der Signale in Anwesenheit von 0,5 μ M Histamin verlangsamten sich von 38 auf 47 ± 7 s (n = 8; $p = 0,0166$), bei 1 μ M Histamin von 25 auf 44 ± 10 s (n = 10, $p < 0,0001$), bei

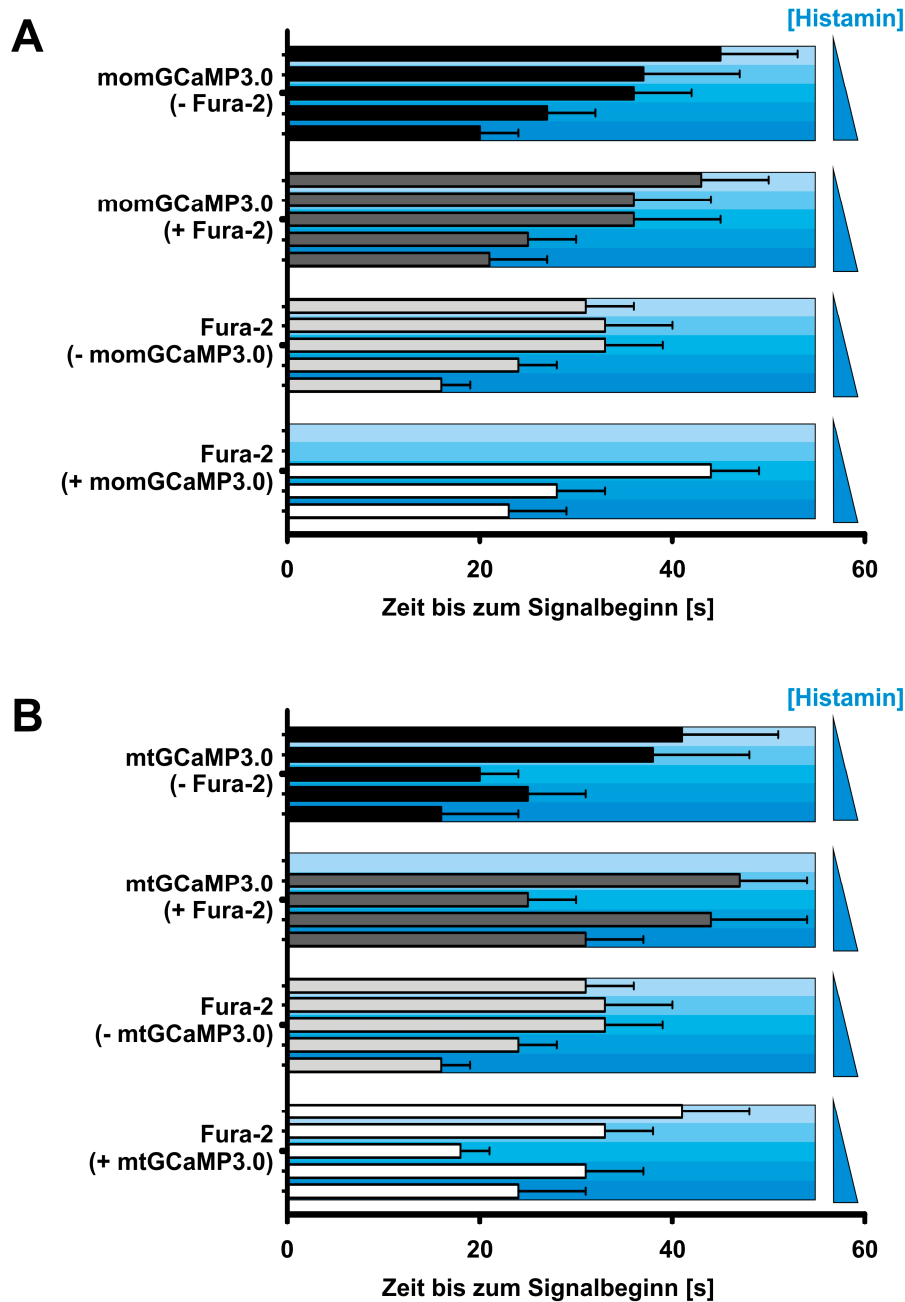


Abb. 3-20: Vergleichende Analyse der zeitlichen Dynamik von Histamin-induzierten Ca^{2+} Signalen in HEK293 Zellen. HEK293-Zellen wurden mit Fura-2 beladen (hellgraue Balken) und mit steigenden Histaminkonzentrationen stimuliert. Zellen, die konstitutiv **(A)** momGCaMP3.0 oder **(B)** mtGCaMP3.0 exprimierten, wurden in An- oder Abwesenheit von Fura-2 mit denselben Histaminkonzentrationen stimuliert. Dazu wurden 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 10 μM und 100 μM Histamin eingesetzt. Die Zeit, die zwischen dem Umschalten der Perfusion auf Histamin-haltiges ES und Beginn der Änderung der Sensorprotein- oder Fura-2 Fluoreszenz verging, wurde für jede Ligandenkonzentration bestimmt. Die steigenden Histaminkonzentrationen sind farbcodiert dargestellt (0,1 μM hellblau bis 100 μM dunkelblau). Die Balken, die der Zeit bis zur Signaldetektion mit den GCaMP3.0 Varianten entsprechen, sind bei Abwesenheit von Fura-2 schwarz und in Anwesenheit von Fura-2 dunkelgrau dargestellt. Die Balken, die der Zeit bis zur Signaldetektion durch Fura-2 in Anwesenheit einer GCaMP3.0 Variante entsprechen sind weiß dargestellt.

10 μM von 16 auf 31 ± 6 s ($n = 46$; $p < 0,0001$) und bei 100 μM von 20 auf 25 ± 5 s ($n = 43$, $p < 0,0001$) (Abb. 3-20B). Die Zeit bis zum Beginn der Fluoreszenzsignale, die mit Fura-2 in Anwesenheit von mtGCaMP3.0 gemessen wurden, blieb hingegen gegenüber Zellen, die nur mit dem Farbstoff beladen waren, nahezu konstant.

In dieser Experimentreihe wurde ein hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisierter Ca^{2+} -sensitiver Farbstoff mit mitochondrial lokalisierten GCaMP3.0 Varianten in einer Zelle kombiniert. Die Ergebnisse zeigen, dass eine räumlich aufgelöste Messung der Ca^{2+} Signale möglich ist. Auch die zeitlichen Komponenten der Signalausbreitung kann analysiert werden. Allerdings scheinen sich Ca^{2+} Farbstoff und die Sensorproteine scheinbar gegenseitig bei der Detektion von Ca^{2+} -induzierten Signalen zu beeinflussen.

3.4.4 Analyse der räumlich-zeitlichen Dynamik von Ca^{2+} Signalen mit verschiedenen GCaMP3.0 Varianten in HEK293-Zellen

Subzellulär lokalisierte GCaMP3.0 Varianten eröffnen die Möglichkeit lokale Ca^{2+} Signale genauer zu studieren. In einer weiteren Serie von Experimenten wurde untersucht, ob sich die in dieser Arbeit hergestellten GCaMP3.0 Varianten für solche Messungen eignen.

Dazu wurden nicht transfizierte HEK293-Zellen mit Fluo-4 beladen. Weiterhin wurden Zellen verwendet, die die GCaMP3.0 Varianten „cyt“, „nuc“, „pm“, „mt“ und „mom“ konstitutiv exprimierten (s. 3.4.2). Die Zellen wurden mit der in 3.4.3 beschriebenen Histaminkonzentrationsreihe stimuliert. Die Auswertung der Messdaten erfolgte durch eine Line Scan Analyse der einzelnen Zellen, wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben (Abb. 3-21A).

In der Auswertung der Stimulationsreihen hatte die als ROI verwendete Linie eine Länge von 30 μm . Bereiche außerhalb der Zelle wurden nicht berücksichtigt. Für jeden Pixel entlang der Linie wurde die Fluoreszenzintensität bestimmt und farbcodiert. Die Analyse wurde für jedes Bild der Stimulationsreihe (für Fluo-4, cytGCaMP3.0, nucGCaMP3.0 $\Sigma = 800$ Bilder; für pmGCaMP3.0, mtGCaMP3.0 und momGCaMP3.0 $\Sigma = 400$ Bilder) wiederholt und zeitabhängig aufgetragen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-21 zusammengefasst.

Die Stimulation mit Histamin (Abb. 3-21B, rote Kästen) führte zu einem Anstieg der Fluoreszenzsignale. Die Zugabe der geringsten Liganden-Konzentration (0,1 μM , Abb. 3-21B) führte zu einem transienten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Mit steigender Histaminkonzentration nahm die Zahl der Signale pro Stimulation bzw. die Dauer des Gesamtsignals zu. Die subzelluläre Verteilung der Fluoreszenzsignale blieb auch während der

Stimulation erhalten, d.h. die Fluoreszenzsignale der Sensorvarianten konnten lokal begrenzt untersucht werden.

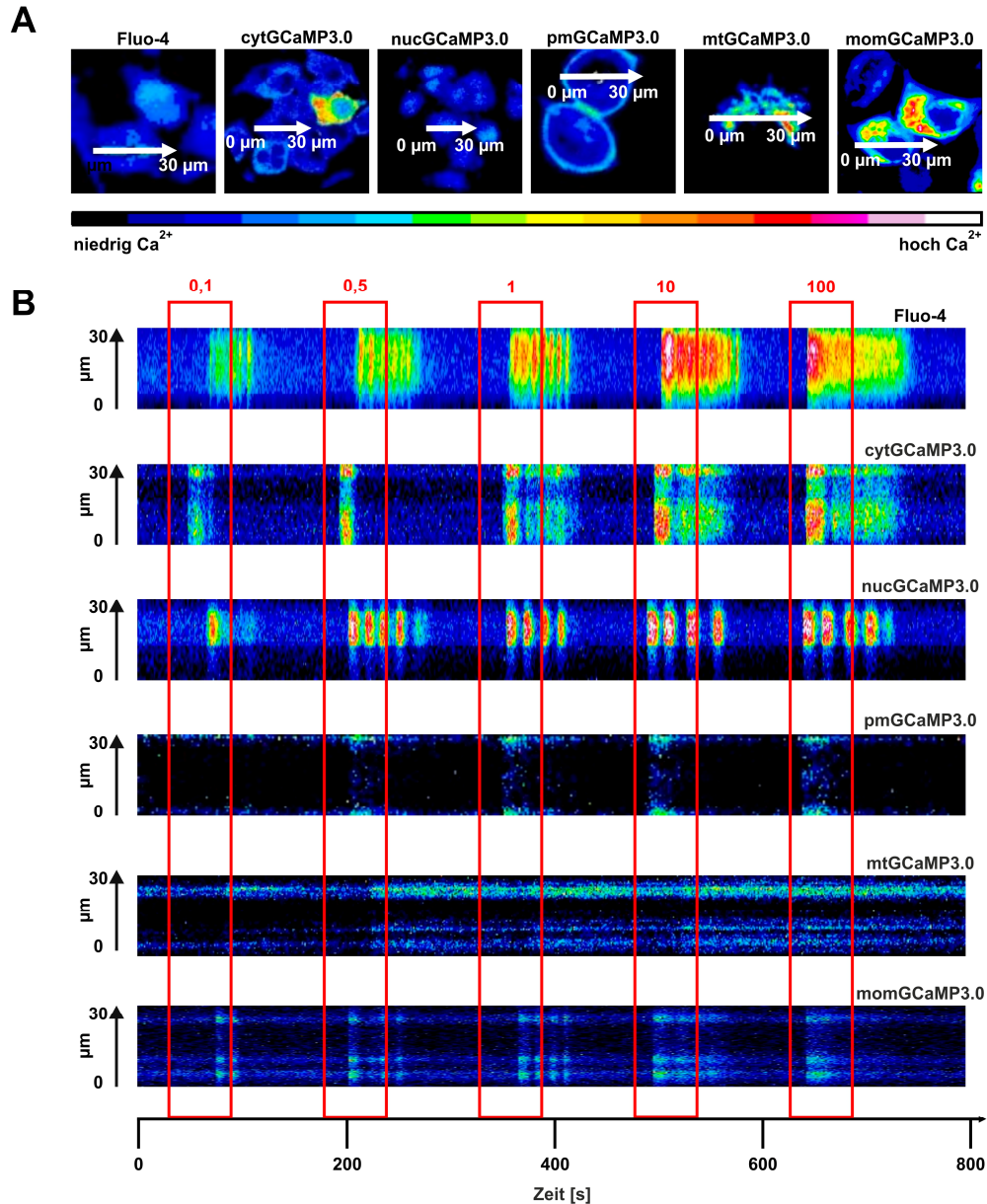


Abb. 3-21: Line Scan Analyse von Histamin induzierten Ca^{2+} Signalen. HEK293-Zellen, die mit Fluo-4 beladen worden waren bzw. konstitutiv eine der GCaMP3.0 Varianten exprimierten, wurden mit Histamin in steigenden Konzentrationen stimuliert. Die Messungen wurden mit FluoView (Olympus) aufgezeichnet und in ImageJ analysiert. (A) Anhand von Übersichtsbildern wurden einzelne Zellen ausgewählt, durch die ROI entlang einer Linie (Länge: ~30 µm) definiert wurden. Für jeden Pixel entlang der Linie wurde die Fluoreszenzintensität bestimmt und farbkodiert. Diese „Pseudo-Line-Scan“-Analyse wurde für jedes Bild der Stimulationsreihe wiederholt und ist in (B) als Zeitverlauf dargestellt. Während der Messung wurde die Perfusionslösung jeweils für 60 s (rote Kästen) auf 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM, 10 µM oder 100 µM Histamin umgestellt. Nach jeder Liganden-Applikation wurden die Zellen für 90 s mit ES-Lösung ohne Ligand umspült.

Die Ca^{2+} Signale, die mit Fluo-4 bzw. den GCaMP3.0 Varianten registriert wurden, unterschieden sich auch hinsichtlich des Signalbeginns. Die Zeitdauer bis zum ersten Signaleinsatz aller Zellen, die auf die verschiedenen Histaminkonzentrationen reagiert haben, wurden bestimmt und in Abb. 3-22 zusammengefasst (s.a. Abb. 3-20 für mt und mom).

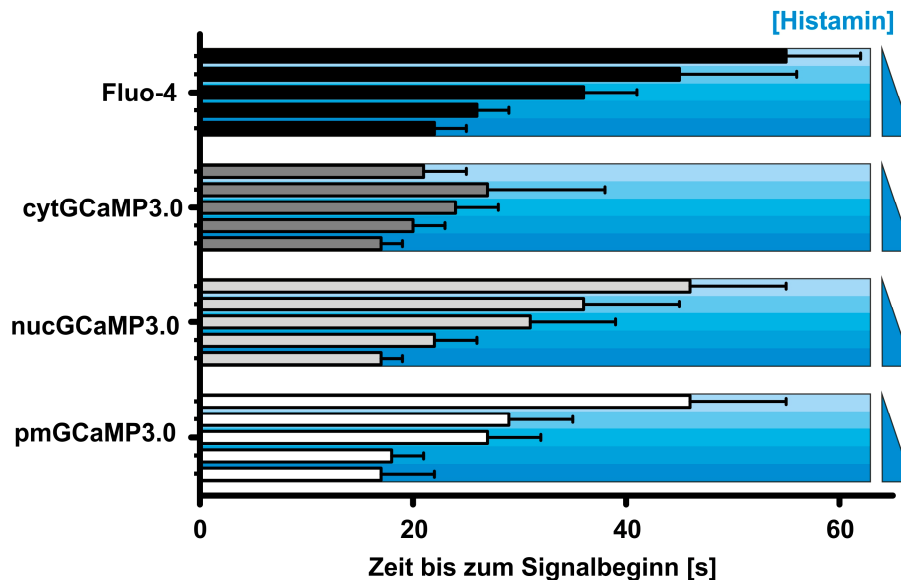


Abb. 3-22: Beginn des ersten Fluoreszenzsignals in HEK293-Zellen nach Stimulation mit Histamin. HEK293-Zellen, die mit Fluo-4 beladen wurden bzw. konstitutiv cytGCaMP3.0, nucGCaMP3.0 oder pmGCaMP3.0 exprimierten, wurden mit steigenden Histaminkonzentration stimuliert. Der Signaleinsatz, d.h. die Zeit, die zwischen dem Umschalten der Perfusion auf Histamin-haltiges ES und der resultierenden Änderung der Indikatorfluoreszenz verging, wurde für jede Ligandenkonzentration bestimmt und aufgetragen. Zur Stimulation der Zellen wurden 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 10 μM und 100 μM Histamin eingesetzt. Die steigenden Histaminkonzentrationen sind farbcodiert dargestellt (0,1 μM hellblau bis 100 μM blau).

In Fluo-4 beladenen Zellen dauerte es 51 ± 7 s (0,1 μM ; n=6), 35 ± 5 s (0,5 μM ; n=35) und 36 ± 5 s (1 μM ; n = 100) bis das Signal detektiert wurde (Abb. 3-22). Mit allen GCaMP3.0 Varianten wurden die Signale schneller detektiert als mit Fluo-4. Die schnellste Variante war cytGCaMP3.0. Es dauerte 21 ± 4 s (0,1 μM ; n = 53), 27 ± 11 s (0,5 μM ; n = 167) und 24 ± 4 s (1 μM ; n = 194) bis zur Detektion des ersten Signals. Ähnlich schnell war pmGCaMP: bei 0,5 μM Histamin dauerte es 29 ± 6 s (n = 52), bei 1 μM Histamin 27 ± 5 s (n = 51) bis zum Signalbeginn (Abb. 3-22). Etwas langsamer aber untereinander vergleichbar schnell reagierten nucGCaMP3.0, mtGCaMP3.0 und momGCaMP3.0 (Abb. 3-20, Abb. 3-22, s. Anhang, Tab. 6-9).

Wurden die HEK293-Zellen mit höheren Histaminkonzentrationen (10 μM und 100 μM) stimuliert, waren die Signaleinsatzzeiten der verschiedenen Varianten sowie von Fluo-4 nicht mehr zu unterscheiden (Abb. 3-22).

Die Experimente zeigten, dass die Verwendung der modifizierten GCaMP3.0 Varianten in HEK293-Zellen eine zeitaufgelöste Messung lokaler Ca^{2+} Signale z.B. an der Plasmamembran bzw. in oder an den Mitochondrien ermöglichte.

3.5 AAV-vermittelte Expression von GCaMP3.0 Varianten in einer kortikalen Primärkultur

Die GCaMP3.0 Sensoren sollen zukünftig benutzt werden, um neuronale Signalprozesse zu untersuchen. Deshalb wurden die Sensorproteine in Primärzellkulturen des Rattenkortex (*rattus norvegicus*) exprimiert. Eine Möglichkeit Transgene in Primärzellkulturen einzubringen, besteht in der Verwendung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren (rAAV) als Genfähren. Von diesen Viren können unterschiedliche Subtypen, sogenannte Serotypen, hergestellt werden. AAV-Serotypen unterscheiden sich in der Proteinzusammensetzung der Virushülle, wodurch die Präferenz eines AAV bestimmt wird, verschiedene Gewebearten oder Subpopulationen von Zellen bevorzugt zu infizieren.

3.5.1 Testtransduktion kortikaler Primärzellen

Bevor die GCaMP3.0 Varianten in kortikalen Primärzellkulturen exprimiert wurden, musste geprüft werden, welche AAV-Serotypen geeignet sind, bevorzugt Neuronen zu transduzieren. Dazu wurden Kortex Zelldissoziate am 8. Tag nach dem Aussäen (8. *day in vitro*, DIV) mit sechs verschiedenen rAAV-Serotypen transduziert (rAAV-1, -2, -4, -6, -8 und -9). Als Marker-Protein, um eine erfolgreiche Transduktion nachzuweisen, kodierten alle Serotypen EGFP unter der Kontrolle des CMV Promotors. Am 16. DIV wurden die Zellen fixiert. Um die in Kortex-Präparationen enthaltenen Neuronen und Gliazellen zu unterscheiden, wurden die Präparate mit spezifischen Antikörpern gegen ein neuronales Marker-Protein (anti-*microtubule-associated protein 2*, αMAP2 ; Abb. 3-23A2) und ein Marker-Protein für Gliazellen (anti-*glial fibrillary acidic protein*, αGFAP ; Abb. 3-23A3) gefärbt.

In Abb. 3-23B ist exemplarisch die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Transduktion kortikaler Primärzellen mit rAAV-6-EGFP dargestellt. Im Gegensatz zu den nicht mit AAV inkubierten Zellen wurde in den Zellen, die mit Viren inkubiert worden waren, eine starke

EGFP-Fluoreszenz detektiert (vgl. Abb. 3-23A1 und B1). Die angefärbten Zellen konnten im Wesentlichen zwei morphologischen Zelltypen zugeordnet werden. Die meisten EGFP-exprimierenden Zellen wiesen gleichmäßig große Zellkörper und lange Fortsätze auf. Von den Somata gingen meist zwei, häufig auch mehr Fortsätze aus. Auch MAP2 positiv gefärbte Zellen zeigten diese Morphologie (Abb. 3-23A2 und B2). In der Überlagerung der Einzelbilder zeigt sich, dass die EGFP Fluoreszenz und die Fluoreszenz der MAP2-Färbung in den gleichen Zellen vorhanden ist und z.T. kolokalisiert ist (Abb. 3-23B4, Sterne). Somit sind EGFP-positive Zellen, die diese Morphologie besitzen, Neurone.

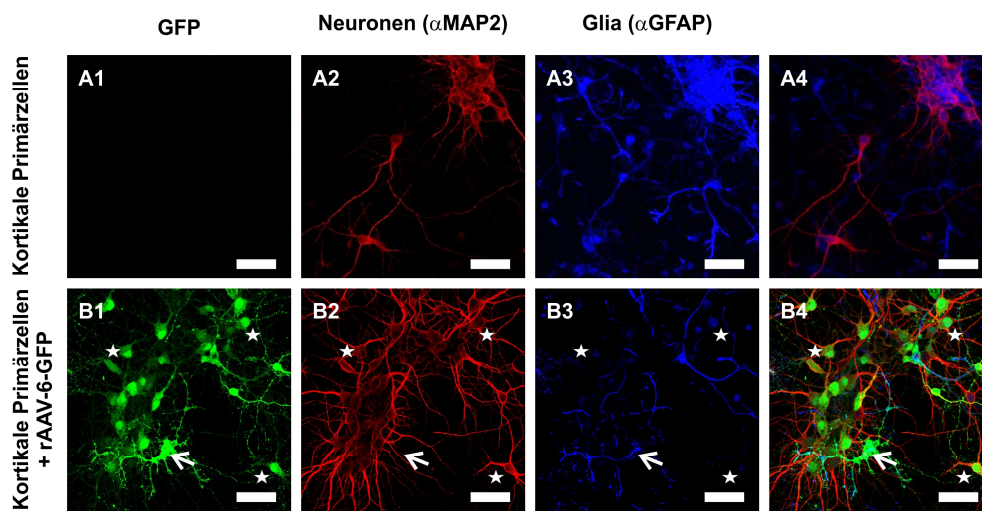


Abb. 3-23: Transduktion kortikaler Zellen mit rAAV-6-GFP. Zellpräparationen aus embryonalem Rattenkortex (A1-A4) wurden mit rAAV Serotyp 6 inkubiert (B1-B4). Zum Transduktionsnachweis kodierte der Virus EGFP unter der Kontrolle des CMV Promotors (B1). Zur Unterscheidung zwischen Neuronen und Gliazellen wurden mit α MAP2 (Neurone, A2 und B2, Sekundär-AK α MAP2) und α GFAP (Gliazellen, A3 und B3, Sekundär-AK α GFAP) Antikörpern gefärbt. Sterne markieren einige erfolgreich transduzierte Neurone. Der Pfeil markiert eine transduzierte Gliazelle. Der eingezeichnete Balken entspricht 50 μ m.

Wenige Zellen, die nach der Transduktion mit rAAV-6 EGFP-Fluoreszenz zeigten, hatten einen ungleichmäßig geformten Zellkörper mit vielen kurzen, stark verzweigten Fortsätzen, die fiederartig ausliefen (Abb. 3-23B1, Pfeil). In Abb. 3-23B3, die die Färbung gegen Gliazellen zeigt, weist der Pfeil auf eine GFAP-positive Zelle. In der Überlagerung der Farbkanäle zeigt sich, dass in der markierten Zelle EGFP und GFAP kovertelt sind (Abb. 3-23B4). Die Inkubation von kortikalen Primärzellkulturen mit dem Serotyp 6 führt somit hauptsächlich zur Transduktion von Neuronen. Eine Übersicht über die

fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Inkubation von Kortex Dissoziaten mit unterschiedlichen AAV Serotypen ist in Abb. 3-24 dargestellt.

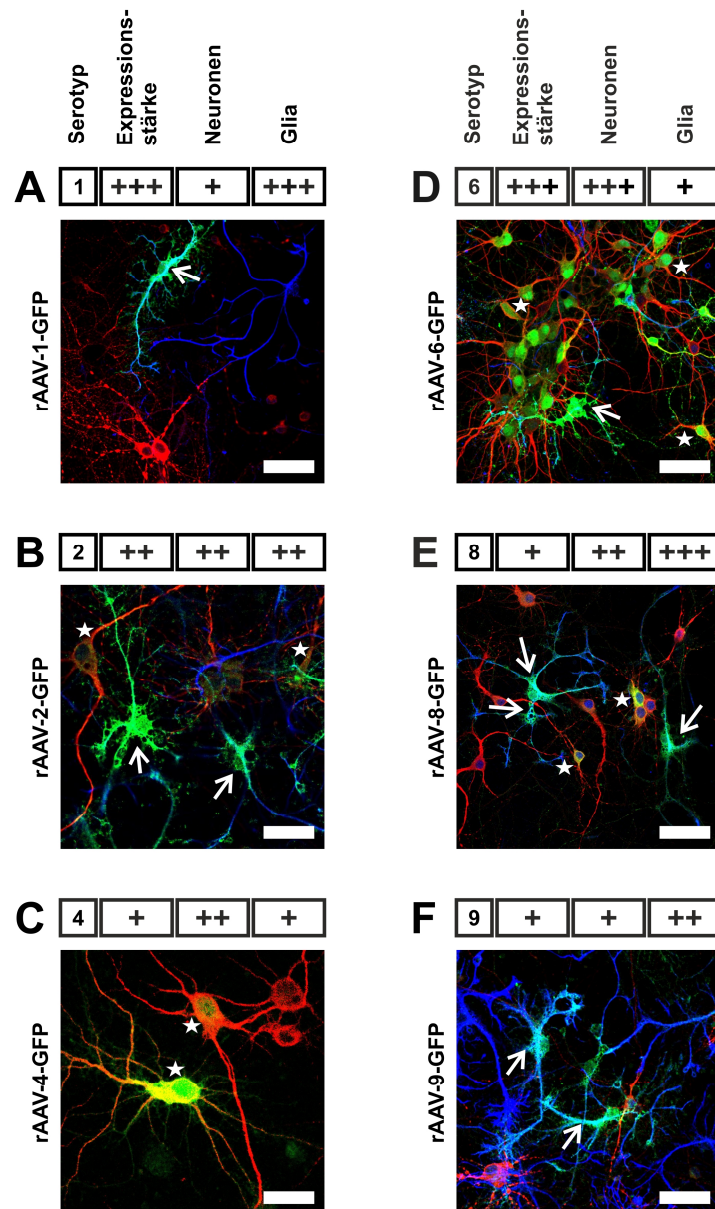


Abb. 3-24: Übersicht über die rAAV vermittelte Expression von EGFP in kortikalen Primärkulturen.

Zellpräparationen aus dem embryonalen Rattenkortex wurden für acht Tage mit verschiedenen rAAV-Serotypen inkubiert. Die rAAV kodierten für EGFP. Die Zellen wurden fixiert und Markerproteine in Neuronen (rbMAP2, Sekundär-AK darb-Cy3, rot) und Gliazellen (chGFAP, Sekundär-AK gtach-Dy649, blau) immunologisch angefärbt. Die Transduktionseffizienz der verschiedenen Serotypen wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Es wurde die Stärke der EGFP-Expression sowie die Präferenz Neurone oder Gliazellen zu transduzieren beurteilt. Sterne markieren transduzierte Neurone, Pfeile kennzeichnen Gliazellen. Der eingezeichnete Balken entspricht in A, B, D, E und F einer Länge von 50 µm, in C einer Länge von 30 µm. + = schwach exprimiert/ sehr wenige Zellen transduziert; ++ = mittelstark exprimiert/ viele Zellen transduziert; +++ = strake Expression/ sehr viele Zellen transduziert.

Die stärkste EGFP Expression und die höchste Transduktionseffizienz wurde mit rAAV-6 (Abb. 3-24D) erzielt. Darüber hinaus schien dieser Serotyp präferentiell Neurone zu transduzieren. Inkubationen mit den Serotypen 8 (Abb. 3-24E) und 9 (Abb. 3-23F) führten vorwiegend zur Transduktion von Gliazellen. Die EGFP-Fluoreszenz war schwächer als nach Transduktionen mit den Serotypen 1, 2 oder 6, jedoch stärker als mit rAAV-4.

Insgesamt zeigten die Experimente, dass keiner der verwendeten rAAV Serotypen die Expression des Markergens exklusiv in Neuronen oder Gliazellen vermittelt. Serotyp 6 ist jedoch der beste Kandidat um präferentiell Neuronen zu transduzieren. Darüberhinaus führte die Transduktion mit rAAV-6 zu einer starken Expression des Transgens. Daher wurde zur Expression der GCaMP3.0 Varianten in corticalen Primärkulturen ebenfalls der Serotyp 6 benutzt.

3.5.2 Expression von GCaMP3.0 Varianten in kortikalen Neuronen

Es wurden rAAV-6 hergestellt, die das entsprechende GCaMP3.0-Gen zur Expression der Varianten cyt, nuc, pm oder mt enthielten (vgl. 2.7.2). Die mit den Viren inkubierten kortikalen Kulturen wurden nach acht Tagen fixiert und mit α MAP2 gefärbt. Die subzelluläre Verteilung der Sensor Varianten und von MAP2 wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb. 3-25). MAP2 ist gleichmäßig im Zellkörper sowie in den dickeren Abschnitten der Neuriten verteilt (Abb. 3-25A-D, linke Spalte).

In Abb. 3-25A (Mitte) ist ein Neuron gezeigt, das erfolgreich mit rAAV-6-cytGCaMP3.0 transduziert wurde. Das Protein ist sowohl im Zytoplasma des Zellkörpers als auch in den Neuriten zu erkennen. Im Zellkern ist die Fluoreszenz sehr viel schwächer (Abb. 3-25A, Mitte). Die Fluoreszenzsignale von cytGCaMP3.0 und α MAP2 sind teilweise kolokalisiert.

Die Fluoreszenzverteilung der in Abb. 3-25B (Mitte) gezeigten Zelle ist komplementär zu der Verteilung von cytGCaMP3.0: der Kern ist am stärksten gefärbt. Diese Zelle wurde mit rAAV-6-nucGCaMP3.0 transduziert. Die Überlagerung der GCaMP3.0-Fluoreszenz mit der Färbung von MAP2 zeigt, dass es sich bei der transduzierten Zelle ebenfalls um ein Neuron handelt (Abb. 3-25, rechts).

Für pmGCaMP3.0 wurden die Fluoreszenzsignale an der äußeren Begrenzung des Zellkörpers detektiert (Abb. 3-25C, Mitte, Pfeilkopf). Darüber hinaus wurde auch in den Neuriten eine Verteilung des Proteins in der Plasmamembran beobachtet (Abb. 3-25C, Mitte, Pfeile). Dies wird besonders in der Überlagerung der pmGCaMP3.0-Fluoreszenz mit der MAP2-Färbung deutlich (Abb. 3-25, rechts, Pfeilkopf).

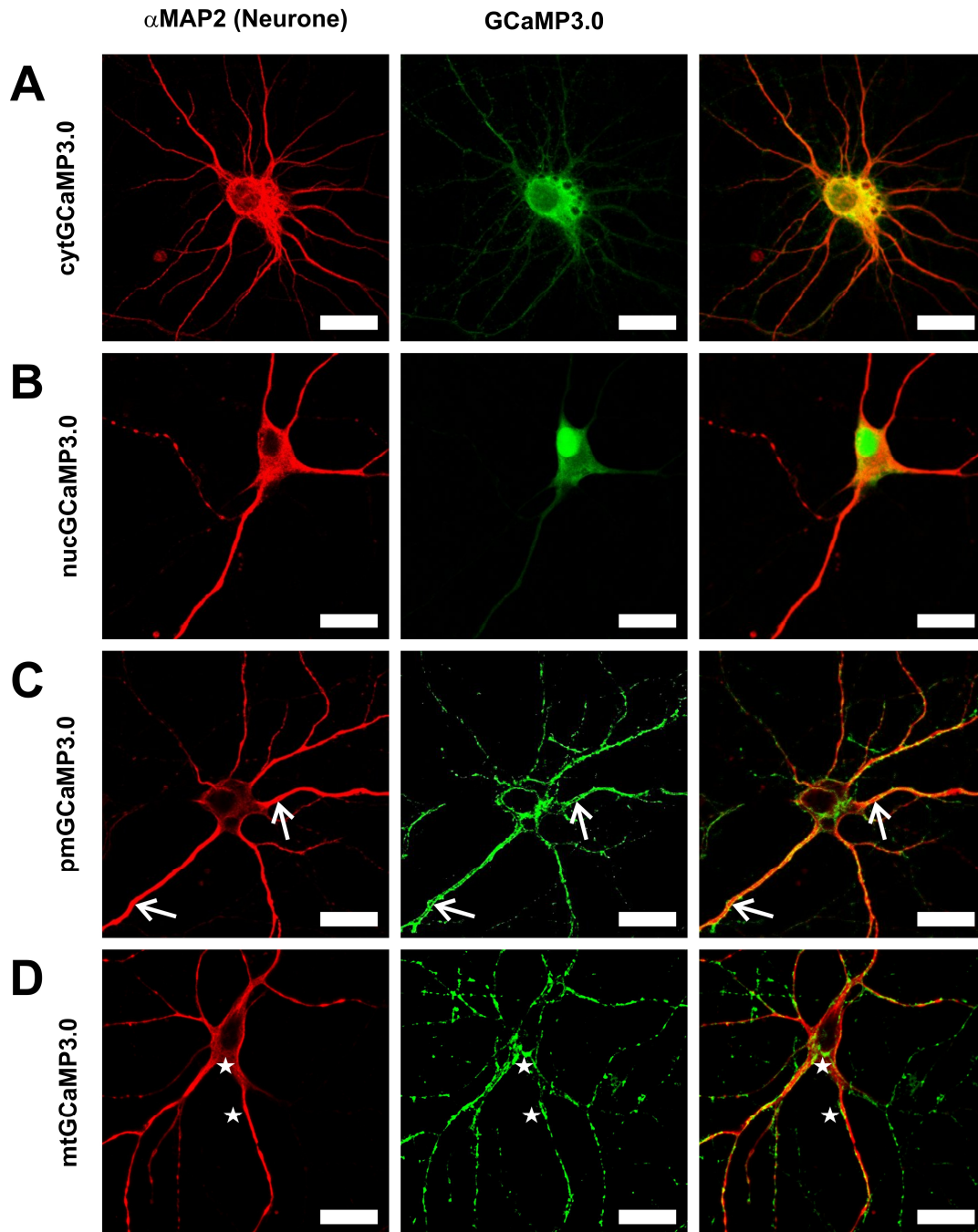


Abb. 3-25: Subzelluläre Verteilung verschiedener GCaMP3.0 Varianten in kortikalen Neuronen. Zellpräparationen aus dem embryonalen Rattenkortex wurden für acht Tage mit rAAV-6-cytGCaMP3.0 (A), -nucGCaMP3.0 (B), -pmGCaMP3.0 (C) oder -mtGCaMP3.0 (D) inkubiert. Neurone wurden immunologisch durch eine Färbung von MAP2 (r α MAP2, Sekundär-AK darb-Cy3, rot) identifiziert. Die subzelluläre Verteilung der GCaMP3.0 Varianten (Mitte) und MAP2 (links) wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Lokalisation von pmGCaMP3.0 in der Plasmamembran im Bereich der Neuriten ist mit Pfeilen markiert. Mitochondrien (D) sind exemplarisch mit Sternen markiert. Der eingezeichnete Balken entspricht einer Länge von 20 μ m.

Das Verteilungsmuster von mtGCaMP3.0 weicht von den Verteilungsmustern der anderen Varianten noch einmal deutlich ab. Das Protein scheint „Aggregate“ zu bilden, die sowohl im Zellkörper als auch in den Neuriten verteilt sind (Abb. 3-25D, Mitte, Sterne). Eine solche Proteinverteilung in den Neuriten könnte ein Hinweis auf das Absterben eines Neurons sein. In diesem Fall sollte aber auch die Fluoreszenz von MAP2 und mtGCaMP3.0 gleichverteilt sein. Da sich die MAP2 Färbung nicht von der in den zuvor beschriebenen Zellen (vgl. Abb. 3-25A-C, links mit Abb. 3-25D, links) unterscheidet, scheint die Verteilung von mtGCaMP3.0 das Verteilungsmuster der Mitochondrien in den Neuronen wiederzugeben.

3.5.3 Messung lokaler Ca^{2+} Signale in kortikalen Neuronen

Kortikale Zellen, die entweder mit Fluo-4 beladen worden waren (Abb. 3-26A, oben) oder eine GCaMP3.0 Variante exprimierten (Abb. 3-26B-D, oben), wurden durch die zweifache Erhöhung der extrazellulären Kalium Konzentration ($[\text{K}^+]_e$) auf 55 mM depolarisiert (Abb. 3-26, unten, grauer Kasten). Die Depolarisation führte in den Zellen zu einem transienten Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch Aktivierung von spannungssensitiven Ca^{2+} Kanälen.

Die Auswertung der Messreihen erfolgte mit ImageJ. Dazu wurde, wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, ein Line-Scan (Länge $\sim 35 \mu\text{m}$) in einzelnen Zellen durchgeführt (Abb. 3-26, oben). Entlang der Linie wurde die Fluoreszenzintensität bestimmt und farbkodiert aufgetragen. Die Analyse wurde für jedes Bild einer Stimulation ($\Sigma_{\text{Bilder}} = 75$) wiederholt und gegen die Zeit aufgetragen. In Abb. 3-26 (untere Reihe) ist die Auswertung für Neurone dargestellt, die mit Fluo-4 beladen wurden oder cytGCaMP3.0, nucGCaMP3.0 bzw. pmGCaMP3.0 exprimierten.

Die Detektion der induzierten Ca^{2+} Signale mit Fluo-4, cytGCaMP3.0, nucGCaMP3.0 und pmGCaMP3.0 unterschied sich hinsichtlich des zeitlichen Signalbeginns, der Signalverteilung innerhalb der Zelle sowie der Signalintensität. Als Beginn des Signals wurde der Zeitpunkt definiert, an dem die auf die Basal- und Hintergrundfluoreszenz normierte Fluoreszenzintensität einen kritischen Schwellenwert zum ersten Mal überschritt (vgl. 2.12.3). Das Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzsignal von Fluo-4 wurde während der Depolarisation im gesamten Neuron detektiert. Die Fluoreszenzintensität erreichte dabei das Zweifache der Basalfluoreszenz. Mit Fluo-4 wurde die Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach 6 s registriert (Abb. 3-26A).

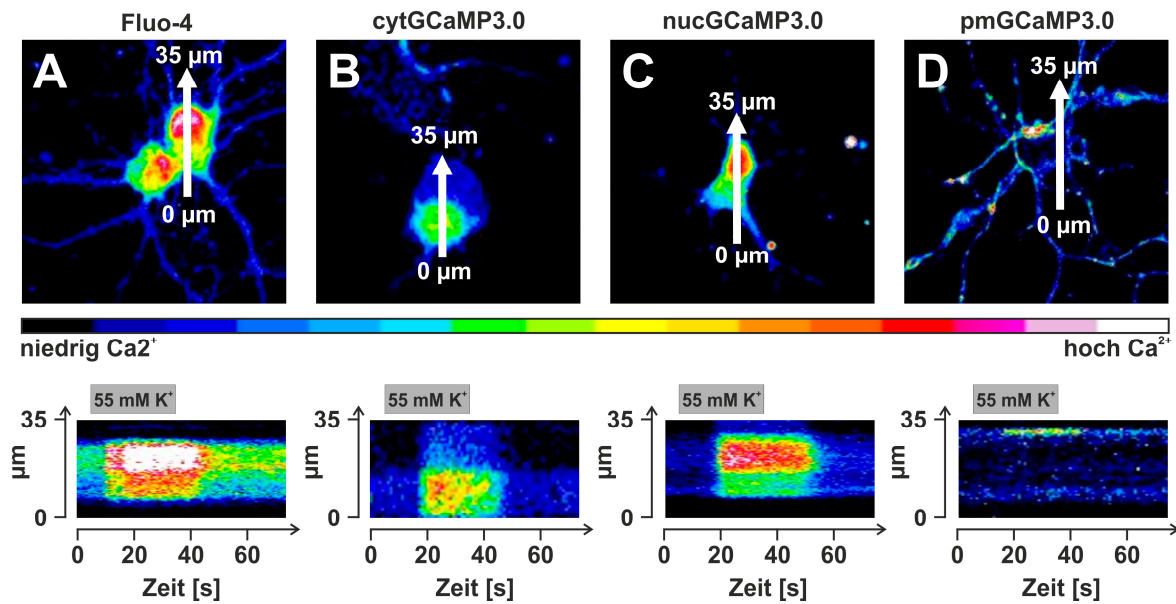


Abb. 3-26: Line Scan Analyse von Depolarisations-induzierten Ca^{2+} Signalen. Korticale Zellen, die mit Fluo-4 beladen wurden (A), bzw. cytGCaMP3.0 (B), nucGCaMP3.0 (C) oder pmGCaMP3.0 (D) exprimierten, wurden mit einer hohen $[\text{K}^+]$ stimuliert. Die Messungen wurden mit Fluoview (Olympus) aufgezeichnet und in ImageJ analysiert. Anhand von Übersichtsbildern (obere Reihe) wurden einzelne Zellen ausgewählt, durch die ROI entlang einer Linie (35 μm , Pfeil) definiert wurden. Für jeden Pixel entlang der Linie wurde die Fluoreszenzintensität bestimmt und farbkodiert. Diese „Pseudo-Line-Scan“-Analyse wurde für jedes aufgenommene Bild ($\Sigma = 75$) wiederholt und ist in der unteren Reihe als Zeitverlauf dargestellt. Während der Messung wurde die Perfusionslösung für 30 s auf 55 mM K^+ umgestellt. Nach der Applikation wurden die Zellen für 40 s mit ES-Lösung mit 5 mM K^+ umspült.

Es dauerte 13 s bis sich die Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzintensität von cytGCaMP3.0 erhöhte (Abb. 3-26B). Die transiente Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]$ während der Depolarisation wurde sowohl im Zellkörper als auch in den Fortsätzen gemessen. Das Fluoreszenzsignal stieg im Zytoplasma um das Dreifache der Basalfluoreszenz an während es im Zellkern nahezu auf dem Niveau der Basalfluoreszenz blieb.

In dem Neuron, das nucGCaMP3.0 exprimierte, wurden die ersten Signale 15 s nach der Stimulation mit K^+ gemessen (Abb. 3-26C). Während die Fluoreszenzintensität im Zytoplasma um das Anderthalbfache anstieg, wurde im Zellkern die vierfache Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Basalfluoreszenz gemessen.

Die Fluoreszenzsignale, die nach dem Einstrom von Ca^{2+} in das Neuron gemessen wurden, das pmGCaMP3.0 exprimierte, waren lokal auf einen kleinen Bereich der Plasmamembran

beschränkt (Abb. 3-26D). Das Signal wurde 11 s nach Beginn der Stimulation detektiert und erreichte eine Intensität, die etwa der doppelten Basalfluoreszenz entsprach.

Diese ersten Experimente zeigen, dass es durch die homogene Verteilung von Fluo-4 in einem Neuron schwierig ist, Aussagen über lokale Änderungen der $[Ca^{2+}]$ zu treffen. Die Verwendung der modifizierten GCaMP3.0 Varianten ermöglichte jedoch die Messung von sehr lokalen Ca^{2+} Signalen etwa im Kern oder an der Plasmamembran. Daher sind diese lokalisierten GECI vielversprechende Werkzeuge zur Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Dynamik des sekundären Botenstoffes Ca^{2+} .

4 Diskussion

Calcium ist für die zelluläre Signalverarbeitung ein wichtiger sekundärer Botenstoff und reguliert eine Vielzahl biologischer Funktionen. Die experimentelle Aufklärung der zeitlichen und räumlichen Ca^{2+} Dynamik ist essentiell für ein besseres Verständnis der Art und Weise, wie Ca^{2+} zelluläre Funktionen beeinflusst. Neben der elektrophysiologischen Messung Ca^{2+} getragener Ströme wird das Ca^{2+} Imaging als Methode zur Visualisierung der Ca^{2+} Dynamik in lebenden Zellen immer wichtiger. Die optische Darstellung von Ca^{2+} Konzentrationsänderungen bietet die Möglichkeit nicht nur globale Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ darzustellen und deren zeitliche Komponente abzubilden, sondern erlaubt auch die Analyse der räumlichen Ausdehnung der Signale sowie die Beobachtung kleiner, lokaler Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ein unverzichtbares molekulares Werkzeug für Ca^{2+} Imaging Methoden sind optische Ca^{2+} Indikatoren. Diese können synthetischer Natur oder genetisch kodiert sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der genetisch kodierte Ca^{2+} Indikator GCaMP3.0 durch das Anfügen kurzer Signalsequenzen so modifiziert, dass das Sensorprotein an bzw. in unterschiedliche subzelluläre Kompartimente gelenkt werden kann. Es wurden Sensorvarianten generiert, die an der Plasmamembran, in der mitochondrialen Matrix, an der mitochondrialen Außenmembran oder am Golgi-Apparat lokalisieren (vgl. 3.2). Einige dieser Sensorvarianten sowie eine weitere Variante, die vorwiegend im Zellkern lokalisiert ist, wurden biophysikalisch charakterisiert (vgl. 3.3) und funktionell in HEK293 Zellen (vgl. 3.4) sowie in Primärzellen aus dem Rattenkortex exprimiert (vgl. 3.5). Die spezifische Lokalisierung der GCaMP3.0 Varianten in den beschriebenen Zelltypen ermöglichte die zeitaufgelöste Messung lokaler Ca^{2+} Signale.

4.1 Herstellung spezifisch lokalisierter GCaMP3.0 Varianten

GCaMP3.0 ist ein genetisch kodierter Ca^{2+} Indikator (*genetically encoded Ca^{2+} indicator*, GECI), der bereits erfolgreich zur Detektion von Ca^{2+} Signalen, unter anderem in *whole mount*- und Schnittpräparationen von Mausretinae (Borghuis et al., 2011), im Tectum des Zebrafisches (Del Bene et al., 2010), sowie in Verhaltensexperimenten mit Mäusen (Dombeck et al., 2010; Huber et al., 2012; Petreanu et al., 2012; Tian et al., 2009), Fliegen (Chiappe et al., 2010; Seelig et al., 2010) und Würmern (Tian et al., 2009) eingesetzt wurde.

GCaMP3.0 ist ein vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiertes Protein (Abb. 4-1A), sodass Ca^{2+} -abhängige GCaMP3.0 Fluoreszenzsignale hauptsächlich die Dynamik der gesamtytoplasmatischen $[\text{Ca}^{2+}]$ wiedergeben. Lokale Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]$, z.B. in Organellen oder in der Nähe Ca^{2+} -permeabler Kanäle in der Plasmamembran, sind mit GCaMP3.0 nur schwer -wenn überhaupt- zu erfassen. In vielen physiologischen Prozessen spielen jedoch genau diese lokalen Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]$ eine Schlüsselrolle. So ist es seit Jahren unstrittig, dass Mitochondrien in nahezu allen Zellen eine Ca^{2+} Puffer-Funktion ausüben (Pizzo et al., 2012). Dabei treten die Mitochondrien in engen räumlichen Kontakt mit dem ER und nehmen Ca^{2+} unmittelbar nach der Freisetzung auf. Dies führt zu einer Modellierung des zytoplasmatischen Ca^{2+} Signals (Franzini-Armstrong, 2007; Pizzo and Pozzan, 2007). Die Aufnahme von Ca^{2+} in die Mitochondrien erfolgt durch den mitochondrialen Ca^{2+} Uniporter (MCU, Baughman et al., 2011; De Stefani et al., 2011), der eine sehr geringe Affinität für Ca^{2+} hat (20 - 50 μM). Nach der Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER steigt die zytosolische $[\text{Ca}^{2+}]$ auf Werte von 1 μM - 3 μM (Berridge et al., 2000). Der MCU ist bei diesen Konzentrationen kaum geeignet Ca^{2+} schnell in die Mitochondrien zu transportieren. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass Mikrodomänen zwischen Mitochondrien und dem ER in unmittelbarer Nähe der IP_3 -abhängigen Ca^{2+} Kanäle existieren. Während der IP_3 -Kanalöffnung wären die Mitochondrien einer hohen $[\text{Ca}^{2+}]$ ausgesetzt, sodass der MCU Ca^{2+} in die Mitochondrien importieren könnte. Inzwischen sind diese sogenannten Ca^{2+} Hotspots nachgewiesen, nachdem Giacomello et al. (2010) einen niederaffinen, ratiometrischen Ca^{2+} Indikator (D1cpV, Palmer et al., 2006) an die Außenmembran der Mitochondrien lenkten. Der Sensor detektierte Ca^{2+} Signale auf der mitochondrialen Oberfläche. Da es sich um einen ratiometrischen Ca^{2+} Sensor handelt, konnte die $[\text{Ca}^{2+}]$ der Hoch- Ca^{2+} Domänen bestimmt werden. Sie beträgt bis zu 20 μM und ist somit ausreichend hoch, um eine schnelle Aufnahme des freigesetzten Ca^{2+} durch den MCU zu gewährleisten. Durch Ca^{2+} Imaging-Experimente mit einem vorwiegend zytoplasmatisch lokalisierten Indikator wären diese Ca^{2+} Hotspots unentdeckt geblieben.

Um die Detektion lokaler Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]$ mit GCaMP3.0 zu ermöglichen, wurde das Sensorprotein im Rahmen dieser Arbeit um Lokalisierungs-Signalsequenzen erweitert (vgl. 3.2.1). So wurden GCaMP3.0 Varianten generiert, die nach Expression in HEK293-Zellen an der Innenseite der Plasmamembran (pmGCaMP3.0; Abb. 4-1C), in der mitochondrialen Matrix (mtGCaMP3.0; Abb. 4-1D), in der mitochondrialen Außenmembran (momGCaMP3.0; Abb. 4-1E) oder im Golgi-Apparat (golgiGCaMP3.0; Abb. 4-1F) lokalisiert sind (vgl. 3.2.2). Zusätzlich wurde eine GCaMP3.0 Variante charakterisiert, die während

meiner Masterarbeit entstanden war und vorwiegend nukleär lokalisiert ist (nucGCaMP3.0; Abb. 4-1B).

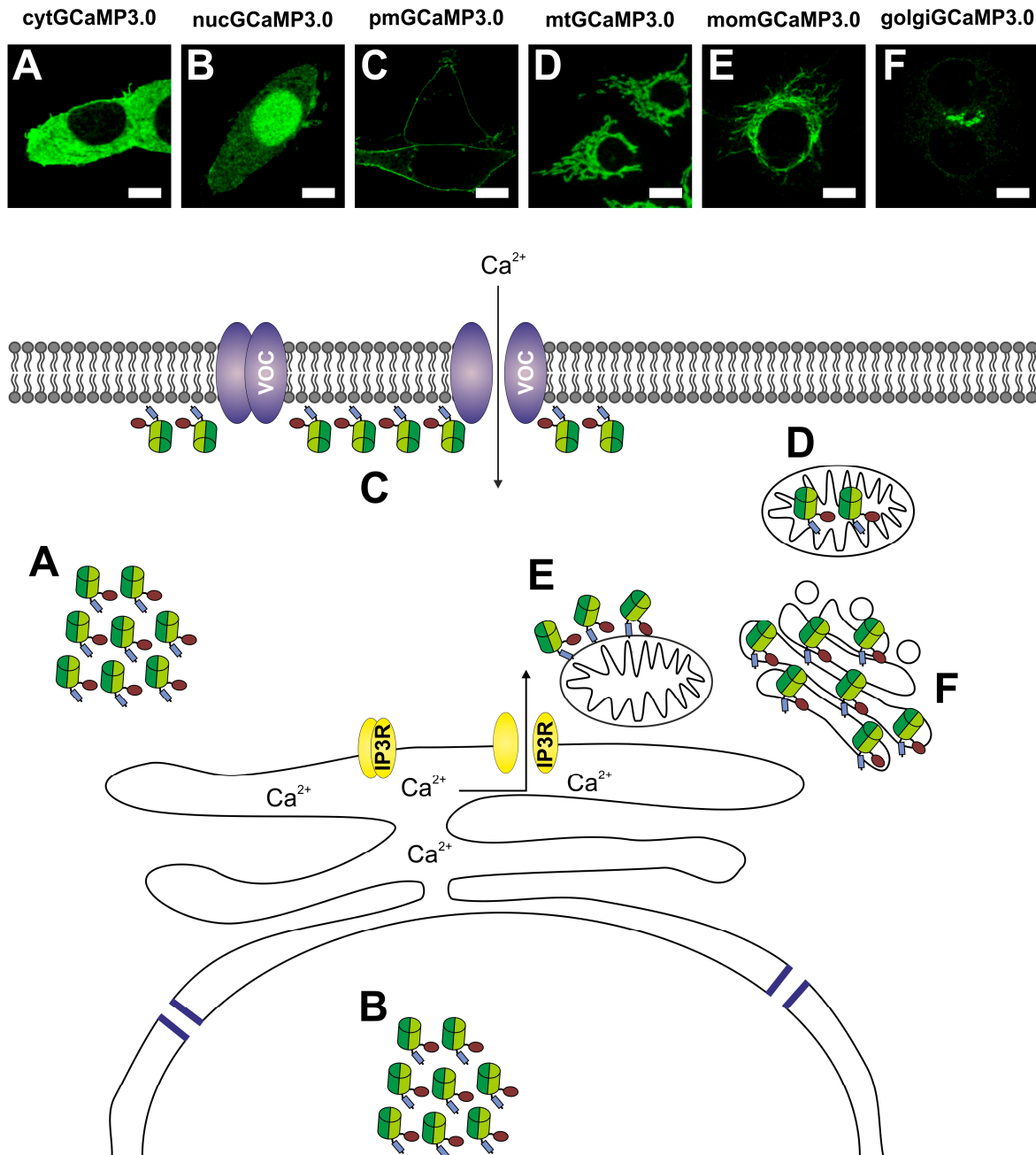


Abb. 4-1: Schematische Darstellung der subzellulären Verteilung verschiedener GCaMP3.0 Varianten. In der oberen Reihe ist die subzelluläre Verteilung von (A) cytGCaMP3.0, (B) nucGCaMP3.0, (C) pmGCaMP3.0, (D) mtGCaMP3.0, (E) momGCaMP3.0 und (F) golgiGCaMP3.0 in HEK293-Zellen dokumentiert. Das Piktogramm verdeutlicht, an welchen Orten in der Zelle die GCaMP3.0 Varianten lokalisiert sind und lokal Ca^{2+} Signale detektieren können. Die Darstellung und Farbkodierung von GCaMP3.0 entspricht Abb. 1-3. Die eingezeichneten Balken entsprechen in A-C sowie E und F 8 μm und in D 10 μm . VOC = spannungsgesteuerter Ca^{2+} Kanal (*voltage operated Ca^{2+} channel*); IP3R = IP₃-Rezeptor.

Die Konstruktion der pmGCaMP3.0 Variante hat deutlich gezeigt, dass die molekularen Komponenten des Sensors einen Einfluss auf das Protein *Targeting* der modifizierten Varianten haben. Eine C-terminal angebrachte Sequenz (CaaX-Box von HRas, vgl. 3.2.2) genügt bereits, um das Fluoreszenzprotein EGFP an die Plasmamembran zu lenken. Dieselbe Strategie war für GCaMP3.0 jedoch nicht erfolgreich. Die Vergrößerung des Abstandes zwischen der CaM Domäne und dem HRas Motiv um 28 Aminosäuren führte zwar zu der angestrebten subzellulären Verteilung, die Menge des membranständigen Sensors war jedoch zu gering, um zuverlässig Ca^{2+} Signale zu detektieren (vgl. 3.2.2). Die Analyse der Kristallstruktur von Ca^{2+} -gebundenem GCaMP2.0 (Akerboom et al., 2009; Wang et al., 2008) zeigt, dass sich CaM eng um das M13 Peptid legt. Die beiden Sensordomänen bilden somit eine kompakte Struktur. Ein kurzes Peptid, wie das HRas-Motiv, könnte durch die CaM/M13 Interaktion maskiert und dadurch die erforderlichen posttranslationalen Modifikationen zur Membraninsertion verhindert werden. Da die Vergrößerung des Abstandes zwischen dem HRas Motiv und CaM zumindest zu einer teilweisen Membranlokalisierung des Sensors führte (s. 3.2.2), stützt dieses Ergebnis die Annahme, dass das direkte Anfügen von Signalsequenzen an die CaM Domäne das *Targeting* von GCaMP3.0 behindert. Im Gegensatz zur C-terminalen Positionierung des Lokalisierungssignals führte die Modifizierung des N-Terminus mit der Membranassoziationssequenz von Neuromodulin zur Lokalisation des Sensorproteins nahezu exklusiv in der Plasmamembran (Abb. 4-1C).

Neben der gewünschten subzellulären Verteilung der Proteine ist es weiterhin wichtig, funktionelle Parameter, wie z.B. die Ca^{2+} Affinität der modifizierten Sensoren zu bestimmen und mit denen des Ausgangskonstrukts zu vergleichen. Für das GCaMP3.0-28aa-CaaX Protein wurde *in vitro* ein EC_{50} für Ca^{2+} von 566 ± 51 nM ($n = 4$) gemessen. Dieser Wert weicht signifikant von den EC_{50} -Werten von cytGCaMP3.0 (234 ± 28 nM, $n = 10$, vgl. 3.3.2; $p < 0,0001$) und dem N-terminal modifizierten pmGCaMP3.0 (261 ± 63 nM, $n = 6$, vgl. 3.3.2; $p < 0,0001$) ab, wohingegen sich die EC_{50} -Werte der beiden zuletzt genannten Varianten nicht statistisch unterscheiden ($p = 0,2528$; student t-tests, two-tailed, Graphpad Prism 5.04). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der cpEGFP-CaM Linker eine größere Beweglichkeit Freiheitsgrad benötigt, als die Aminosäureabfolge, die das N-terminal gelegene M13 Peptid mit dem cpEGFP verbindet (Akerboom et al., 2009). Die Flexibilität von CaM, die für die Ca^{2+} abhängige Interaktion der Domäne mit dem M13 Peptid und mit dem cpEGFP notwendig ist, könnte durch das Anfügen einer zusätzlichen Peptidsequenz an die CaM-Domäne eingeschränkt sein und die Fähigkeit des Sensors Ca^{2+} Signale anzuzeigen beeinflussen. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass Sensorproteine der GCaMP-Familie

vorzugsweise N-terminal modifiziert werden sollten, um ein erfolgreiches Protein *targeting* zu erreichen, welches die Funktion des Sensors nicht beeinflusst.

Kürzlich verwendeten Shigetomi et al. (2010; 2013) ebenfalls eine N-terminal modifizierte GCaMP3.0 Variante (Lck-GCaMP3.0) zur Messung von Ca^{2+} Mikrodomänen in der Plasmamembran von Astrozyten. Es handelt sich hierbei um die N-terminale Domäne von Lck, eine SRC Tyrosinkinase, die zur Membranlokalisierung je eine Palmitoylierungs- und eine Myrisoylierungsdomäne enthält (Zlatkine et al., 1997). Im Rahmen meiner Arbeit wurde GCaMP3.0 mit der gleichen Lokalisierungssequenz modifiziert. Dies führte jedoch nicht zu einer Lokalisierung des Sensorproteins in der Plasmamembran sondern zu einer homogenen Verteilung im Cytoplasma (Abb. 4-2). Die Lck-GCaMP3.0-Varianten (Shigetomi et al., 2010; diese Arbeit) unterschieden sich hinsichtlich des Expressionsplasmids sowie einer Aminosäuredeletion (6.3.3). Die Deletion des Arginins an Position 2 des originalen GCaMP3.0 (Tian et al., 2009) ist von Shigetomi nicht durchgeführt worden.

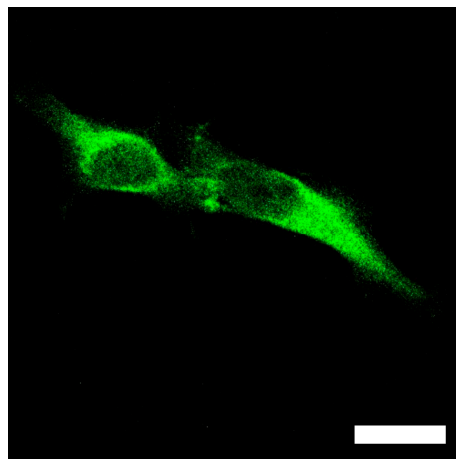


Abb. 4-2: Subzelluläre Verteilung von Lck-GCaMP3.0 nach der Expression in HEK293-Zellen. HEK293 Zellen wurden mit 10 µg pscLCK transient transfiziert. Die subzelluläre Verteilung des Sensorproteins wurde fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Der Balken entspricht einer Länge von 20 µm.

4.2 Charakterisierung der GCaMP3.0 Varianten

Die GCaMP3.0 Varianten „cyt“, „nuc“, „pm“, „mt“ und „mom“ wurden zur funktionellen Charakterisierung konstitutiv in HEK293-Zellen exprimiert (vgl. 3.4.2). Die HEK293-Zelllinie eignet sich zur Charakterisierung von GECIs, denn durch die Stimulation endogener Histaminrezeptoren können reproduzierbar Ca^{2+} Signale induziert werden (vgl. 3.4.1). Die Stimulation von HEK293-Zellen mit Histamin führte zu einer Aktivierung des

Histaminrezeptors Typ 1, da die Transkripte für diesen Rezeptortypen mittels semiquantitativer PCR nachgewiesen werden konnten (vgl. 3.4.1). Die Aktivierung des HRH1 induziert eine Signalkaskade, die über die Aktivierung eines G-Proteins und Stimulation von PLC zu der Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER führt.

Die Histamin induzierten, Ca^{2+} -abhängigen Signale, die mit den verschiedenen Sensorvarianten sowie mit den synthetischen Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffen Fluo-4 und Fura-2 gemessen wurden, konnten drei Signalformen zugeordnet werden: (1) Transiente Signale, (2) Oszillationen und (3) Oszillationen mit erhöhter Basalfluoreszenz (vgl. 3.4.1 und 3.4.3). Abhängig von der zur Stimulation verwendeten Histaminkonzentration variierte der prozentuale Anteil der einzelnen Signalformen. Während niedrige Konzentrationen (0,1 μM oder 0,5 μM Histamin) hauptsächlich kurze, transiente Änderungen des Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzsignals verursachten, wurden durch die Stimulation mit 1 μM Histamin vor allem Oszillationen ausgelöst. Die Stimulation mit den beiden höchsten Histaminkonzentrationen (10 μM - 100 μM) bewirkte meist große, transiente Signale oder Oszillationen auf einem erhöhten Basalfluoreszenzniveau. Somit können über die Histaminkonzentration gezielt Ca^{2+} Signale ausgelöst werden, um die GECI Eigenschaften in HEK293-Zellen zu untersuchen. Ein Nachteil dieses Systems besteht jedoch darin, dass die Zeitskala der Histamin induzierten Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]$ im Sekundenbereich liegt. Einigen physiologisch relevanten Ca^{2+} Signalen liegen jedoch Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]$ zu Grunde, die nur Bruchteile von Sekunden dauern, z.B. der Einstrom von Ca^{2+} durch ligandengesteuerte Ca^{2+} Kanäle in dendritischen Spines (Sabatini et al., 2002). Deshalb sollten GECI auch in bzw. mit anderen Systemen, die über schnellere Kinetiken verfügen, untersucht werden.

Alle oben beschriebenen Signalformen konnten mit synthetischen, Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffen, dem Originalsensor GaMP3.0 sowie mit den Varianten „nuc“, „pm“ und „mom“ gemessen werden. Mit mtGCaMP3.0 wurden hingegen nur transiente Änderungen der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenz registriert. (vgl. 3.4.3). Darüber hinaus dauerte es für mtGCaMP3.0 bis zu 100 s länger, bis die Histamin induzierte Änderung der mtGCaMP3.0 Fluoreszenz nach Stimulationsende wieder auf das Ausgangsniveau zurückkehrte. Diese transienten Änderungen der mtGCaMP3.0 Fluoreszenz wurden auch in Zellen beobachtet, in denen gleichzeitig mit Fura-2 Histamin induzierte Ca^{2+} Oszillationen registriert wurden. Der Farbstoff ist homogen in der Zelle verteilt und gibt somit - im Vergleich zum mtGCaMP3.0 Sensor - vorwiegend zytoplasmatische Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wieder (vgl. 3.4.3). Ähnliche Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzsignale, wie sie mit mtGCaMP3.0 gemessen wurden, sind auch mit einer mitochondrial lokalisierten GCaMP2.0 Variante (mtGCaMP2.0) in HeLa Zellen

beobachtet worden, die mit 100 μM Histamin stimuliert wurden (Chen et al., 2011). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass mtGCaMP3.0 erfolgreich in die Matrix der Mitochondrien transloziert wird und dort funktionell ist.

Auch momGCaMP3.0 kolokalisiert mit einem mitochondrialen Marker (vgl. Abb. 3-8). Als Lokalisierungssignal wurde die Transmembrandomäne (TMD) von Tom20 benutzt. Die Insertion des Sensors kann daher nur in einer $N_{\text{in}}\text{-}C_{\text{Cyt}}$ Orientierung erfolgen. In HEK293-Zellen, die momGCaMP3.0 konstitutiv exprimierten und gleichzeitig mit Fura-2 beladen waren, wurden mit beiden Ca^{2+} Indikatoren ähnliche Fluoreszenzsignale registriert. Die Stimulation von momGCaMP3.0 exprimierenden Zellen mit Histamin in Anwesenheit von FCCP führt zu einer weiteren Zunahme des Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzsignals des Sensors im Vergleich zur Stimulation in Abwesenheit von FCCP. Daraus kann man schließen, dass momGCaMP3.0 erfolgreich in die äußere Membran der Mitochondrien integriert wurde, denn FCCP verhindert die Aufnahme von Ca^{2+} in die Mitochondrien, sodass im Cytosol eine größere Menge Ca^{2+} detektiert werden kann.

Die in Abb. 3-26 dargestellten Änderungen der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzsignale von Fluo-4 und den GCaMP3.0 Varianten nach Stimulation mit steigenden Histaminkonzentrationen zeigen, dass die Zunahme der Fluoreszenzintensität von cytGCaMP3.0 und nucGCaMP3.0 ähnlich groß ist, wie die des synthetischen Farbstoffes Fluo-4. Die Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzänderung von pmGCaMP3.0, mtGCaMP3.0 und momGCaMP3.0 scheint niedriger zu sein, obwohl *in vitro* kein Unterschied in den dynamischen Bereichen der Proteine festgestellt wurde (vgl. 3.3.2). Die Sensorvarianten pmGCaMP3.0 und momGCaMP3.0 sind beide in der Membran verankert. PmGCaMP3.0 ist durch einen Lipidanker mit der Plasmamembran assoziiert und momGCaMP3.0 durch eine TMD in der mitochondrialen Außenmembran integriert. Für die Interaktion des M13 Peptids mit Ca^{2+} -gebundenem CaM ist ein besonderer Grad an Flexibilität notwendig. Darüber hinaus stabilisieren Interaktionen des Peptids mit dem cpEGFP das Chromophor (Akerboom et al., 2009; Wang et al., 2008). Die zur Lokalisierung erforderlichen Modifikationen wurden am N-Terminus von GCaMP3.0 durchgeführt, sodass das M13 Peptid relativ nah an den Membranen „fixiert“ oder zumindest in seiner Flexibilität eingeschränkt sein könnte. Dies könnte ein Grund für die geringeren Änderungen der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenz der membranassoziierten GCaMP3.0 Varianten sein.

Die GCaMP3.0 Variante, die in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist, ist einem basischeren pH-Wert ausgesetzt als die Varianten, die cytoplasmatische oder nukleäre Ca^{2+} Signale wiedergeben (Llopis et al., 1998). Für die Funktion von GCaMP3.0, die unter anderem

auf dem Protonierungsstatus des Chromophors basiert (Akerboom et al., 2009; Wang et al., 2008), spielt der pKa-Wert des Sensors eine entscheidende Rolle. In der Apo-Form, d.h. Ca^{2+} -freies GCaMP3.0, hat das Protein einen pKa-Wert von 8,4 (Akerboom et al., 2012). Der zytosolische pH beträgt $\sim 7,4$. Bei diesem pH liegt das Gleichgewicht des Protonierungsstatus von apoGCaMP3.0 deutlich auf der Seite der protonierten Form, sodass eine niedrige Basalfluoreszenz resultiert. In den Mitochondrien ist der pH mit $\sim 8,0$ zum pKa-Wert von apoGCaMP3.0 verschoben, sodass auch das Gleichgewicht zwischen dem protonierten und deprotonierten Chromphor leicht verschoben ist. Das bedeutet, dass der Sensor in den Mitochondrien bereits bei der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Ruhe}}$ mehr Fluoreszenz emittiert, als die zytosolischen Varianten bei einer ähnlichen $[\text{Ca}^{2+}]$. In *in vitro* Experimenten, bei denen Fluoreszenzemissionsspektren von mtGCaMP3.0 mit steigenden $[\text{Ca}^{2+}]$ bei unterschiedlichen pH-Werten gemessen wurden, wurde dieses Phänomen experimentell bestätigt (Abb. 4-3). Während die Emissionsspektren des Ca^{2+} -gesättigten Sensorproteins für beide pH-Werte übereinanderliegen, ist die Fluoreszenzemission der apo-Form bei pH 8,0 größer als bei pH 7,2.

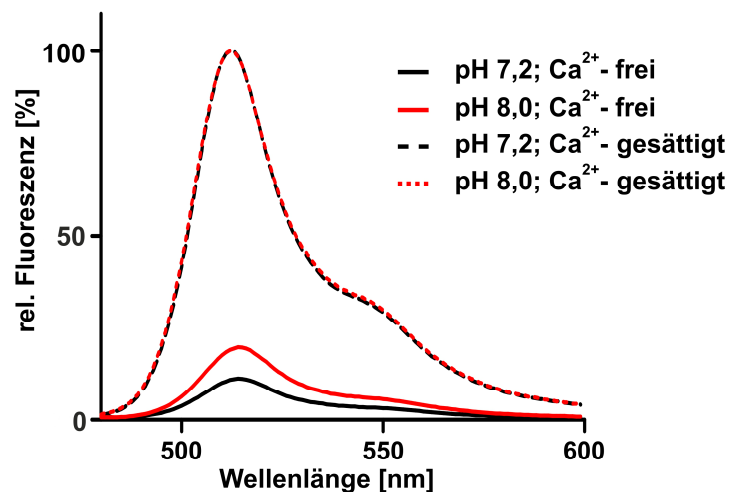


Abb. 4-3: Fluoreszenzemissionsspektren von GCaMP3.0 bei verschiedenen pH-Werten. Die Fluoreszenzemissionsspektren von apoGCaMP3.0 und Ca^{2+} -gesättigtem GCaMP3.0 bei pH 7,2 und pH 8,0 aus jeweils fünf unabhängigen Ca^{2+} Titrationen wurden auf den höchsten gemessenen Fluoreszenzwert normiert und gemittelt.

Für die verschiedenen GCaMP3.0 Varianten wurden EC_{50} -Werte für Ca^{2+} zwischen 234 und 294 nM ermittelt (pH 7,2). In der Originalveröffentlichung und in Folgeveröffentlichungen

wurden Werte von 840 nM (Tian et al., 2009) bzw. 405 nM (Akerboom et al., 2012) unter vergleichbaren experimentellen Verhältnissen berichtet. Für Lck-GCaMP3.0 wurde die Affinität in permeabilisierten HEK293-Zellen abgeschätzt und beträgt 153 nM (Shigetomi et al., 2010).

Im Rahmen meiner Arbeit wurden Histamin induzierte Ca^{2+} Signale auch mit den synthetischen Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffen Fura-2 und Fluo-4 gemessen (vgl. 3.4.3 und 3.4.4), für die Affinitäten von 224 nM und 345 nM publiziert sind (Gee et al., 2000; Grynkiewicz et al., 1985). Auch die Fluoreszenzsignale der Farbstoffe konnten den drei bereits zuvor beschriebenen Signalformen zugeordnet werden. Wurden die Signale mit Fluo-4 gemessen, wurden insgesamt mehr Zellen beobachtet, die ein oszillatorisches Signalverhalten zeigten. Auch mit Fura-2 wurden Oszillationen beobachtet, diese erfolgten jedoch häufiger auf einem erhöhten Basalfluoreszenzniveau. Die beobachteten GCaMP3.0 Fluoreszenzsignalen entsprechen eher den Signalen, wie sie mit Fura-2 gemessen wurden. Daraus kann man schließen, dass die Affinität der Sensor-Varianten unter „zellulären“ Messbedingungen dem Wert entspricht, der für Fura-2 charakteristisch ist (~200 nM).

4.3 Analyse der räumlich-zeitlichen Dynamik von Ca^{2+} Signalen in verschiedenen Zelltypen

Eine Möglichkeit die räumlichen und zeitlichen Komponenten von Ca^{2+} Signalen zu analysieren, besteht darin, einen modifizierten GECI in einem spezifischen Zelltyp zu exprimieren, um lokale Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]$ zu messen und gleichzeitig die globalen Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]$ mit Hilfe eines vorwiegend cytoplasmatisch lokalisierten Farbstoffes zu detektieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden HEK293-Zellen, die konstitutiv eine der mitochondrial lokalisierten GCaMP3.0 Varianten exprimierten, zusätzlich mit Fura-2 beladen und mit Histamin in steigenden Konzentrationen stimuliert (vgl. 3.4.3). Die dadurch ausgelösten Ca^{2+} Signale wurden sowohl durch Fura-2 als auch durch die beiden Sensorvarianten als Änderung der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenz wiedergegeben. Interessanterweise konnten nicht alle Signale, die mit momGCaMP3.0 detektiert wurden, mit Fura-2 beobachtet werden. Umgekehrt konnten nicht alle Signale, die mit Fura-2 detektiert wurden, auch mit mtGCaMP3.0 detektiert werden. Dieses Phänomen trat bei Histaminkonzentrationen von 0,1 μM oder 0,5 μM auf. In Kontrollmessungen mit HEK293-Zellen, die entweder eine der GCaMP3.0 Varianten exprimierten oder nur mit Fura-2 beladen worden waren, wurden die Signale, die durch die niedrigen Histaminkonzentrationen

ausgelöst wurden, jedoch von allen Indikatoren detektiert. Beide verwendeten Ca^{2+} Indikatoren (GCaMP3.0 und Fura-2) haben eine hohe Affinität für Ca^{2+} (s.a. 4.2). Daher ist es möglich, dass einer der Indikatoren die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ so puffert, dass der jeweils andere Indikator das Signal nicht mehr erfasst hat.

Dieses Ergebnis hebt die wesentliche Problematik der Ca^{2+} Puffer Kapazität von optischen Ca^{2+} Indikatoren hervor (Hires et al., 2008, Tian et al., 2012). Die Expression eines hoch affinen Sensors aus der Cameleon-Familie in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) pufferte die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ so sehr, dass die Tiere Verhaltensänderungen zeigten (Kindt et al., 2007; Suzuki et al., 2003). Interessanterweise reichte die Expression des Sensors sogar aus, um den Wildtyp Zustand in Tieren wieder herzustellen, in denen die Expression von Ca^{2+} Bindeproteinen durch *Knockout* Mutagenese unterbunden war (Ferkey et al., 2007). Frühe Experimente mit *Yellow Cameleon* (YC) in HeLa-Zellen zeigten, dass YC3.1 bei Konzentrationen $< 20 \mu\text{M}$ ein sehr schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis hatte, während in Zellen, die $> 30 \mu\text{M}$ YC3.1 enthielten Ca^{2+} stark gepuffert wurde (Miyawaki et al., 1999). Eine Möglichkeit, die Pufferkapazität der Indikatoren herab zu regulieren besteht darin, die Konzentration des GECI oder des Farbstoffes in der Zelle zu reduzieren, obwohl höhere Konzentrationen des GECI das Signal-Rausch-Verhältnis verbessern. In dieser Arbeit wurden die GCaMP3.0 Varianten unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert, der eine hohe Expressionsrate des Transgens bewirkt. Durch die Verwendung schwächerer oder induzierbarer Promotoren könnte die Expressionsstärke der GCaMP3.0 Varianten gezielt reguliert werden.

Eine weitere Möglichkeit die räumliche und zeitliche Dynamik des sekundären Botenstoffes Ca^{2+} in lebenden Zellen zu untersuchen ist die Expression mehrerer GCaMP3.0 Varianten in ein und derselben Zelle. Die in dieser Arbeit hergestellten GCaMP3.0 Varianten eignen sich sehr gut für solche Messungen. In einer Experimentserie, wurden in HEK293-Zellen, die entweder mit Fluo-4 beladen worden waren oder konstitutiv eine der Sensorvarianten exprimierten, Ca^{2+} Signale durch Stimulation mit Histamin in steigenden Konzentrationen erzeugt. Die gemessenen Fluoreszenzsignale von Fluo-4 bei $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Ruhe}}$ waren homogen in der Zelle verteilt, während die Verteilung der Sensor-Fluoreszenzsignale der bereits beschriebenen spezifischen Proteinverteilung in der Zelle entsprach (vgl. 3.2.2, 3.4.2 und Abb. 4-1A-E). Die durch Histamin induzierte Änderung der Fluoreszenzsignale von Fluo-4 wurde in der gesamten Zelle beobachtet. Die Signale der modifizierten GCaMP3.0 Varianten hingegen beschränkten sich während der Stimulation mit Histamin auf definierte Bereiche in der Zelle. Die beobachteten Verteilungsmuster der einzelnen Varianten waren gut voneinander zu unterscheiden (vgl. Abb. 3-21), sodass bei einer gemeinsamen Expression von

verschiedenen Varianten, z.B. nucGCaMP3.0 und mtGCaMP3.0 oder pmGCaMP3.0 und momGCaMP3.0, die gemessenen Signale nicht überlappen. Darüber hinaus wurde kürzlich eine neue auf GCaMP3.0 basierende Sensorgeneration entwickelt, die sogenannten GECOs, die bei Ca^{2+} Bindung im blauen und im roten Bereich des sichtbaren Spektrums emittieren (Zhao et al., 2011). Die beschriebenen Modifikationen zur spezifischen Lokalisierung von GCaMP3.0 könnten auch auf die GECO-Sensoren angewandt werden und so ein paralleles Imaging mehrerer Sensorvarianten weiter vereinfachen.

Das Ziel dieser Arbeit war es nicht nur, GCaMP3.0 so zu modifizieren, dass lokale Ca^{2+} Signale gemessen werden konnten, sondern es sollte auch ermöglicht werden, mit Hilfe der unterschiedlich lokalisierten Varianten die zeitliche Komponente der Ausbreitung von Ca^{2+} Signalen zu messen. Obwohl synthetische Farbstoffe den GECI bzgl. der Kinetik der Signaldetektion überlegen sind, wurden Histamin-induzierte Ca^{2+} Signale in HEK293-Zellen durch alle untersuchten Sensorvarianten schneller (0,1 μM , 0,5 μM und 1 μM Histamin) als mit Fluo-4 oder vergleichbar schnell (10 μM und 100 μM Histamin) detektiert (vgl. 3.4.4). Eine mögliche Begründung liegt in der höheren Ca^{2+} Affinität der Sensorvarianten. Die unterschiedlichen Zeiträume, die bis zur Signaldetektion durch die verschiedenen Sensorvarianten vergingen, könnten jedoch auch auf die unterschiedliche Ca^{2+} Ausbreitung in der Zelle zurückzuführen sein. Somit sollte es möglich sein, die Diffusionswege und -zeiten des sekundären Botenstoffes Ca^{2+} vom „Entstehungsort“ bis zum Wirkungsort durch die Anwendung verschieden lokalisierter GCaMP3.0 Varianten zu analysieren. Das hier benutzte Messverfahren mit einer Aufnahme Frequenz von 1-2 Bildern pro Sekunde ist für diese Analyse jedoch zu langsam. Schnellere Messverfahren sind vor allem dann wichtig, wenn die GCaMP3.0 Varianten in erregbaren Zellen, z.B. Neuronen verwendet werden, da Ca^{2+} Signale in diesen häufig nur Millisekunden andauern und/ oder geringe Signalamplituden zeigen (Berridge, 2006; Berridge et al., 2000; Clapham, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige der hergestellten GCaMP3.0 Varianten erfolgreich durch AAV-vermittelte Transduktion in Primärzellen aus dem embryonalen Rattenkortex exprimiert (vgl. 3.5.2). Um den AAV-Serotypen zu identifizieren, der sich am besten eignete, um GCaMP3.0 in Neuronen zu exprimieren, wurde die Transduktionseffizienz und der Tropismus von sechs unterschiedlichen AAV-Serotypen (1, 2, 4, 6, 8 und 9) evaluiert (vgl. 3.5.1). Kein Serotyp besaß eine Präferenz exklusiv Neurone oder Gliazellen zu transduzieren. Übereinstimmend mit Royo et al. (2008) wurden AAV-1 und AAV-6 als die Serotypen identifiziert, die den größten Anteil der Zellen einer Kultur transduzierten. Während AAV-1 transduzierte Zellen vorwiegend GFAP positiv waren, transduzierte AAV-6

vor allem Neurone. Aufgrund dieser Präferenz wurde AAV-6 für den Gentransfer in kortikalen Primärkulturen gewählt.

Die Funktionalität der Sensorvarianten in Neuronen wurde in ersten Experimenten überprüft, in denen die Primärzellen durch die Erhöhung der $[K^+]_e$ depolarisiert wurden. Dies führt zur Öffnung von spannungsaktivierten Ca^{2+} Kanälen in der Membran und somit zu einem transienten Einstrom von Ca^{2+} in die Zellen. Die exprimierten Varianten („cyt“, „nuc“ und „pm“) registrierten die Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ zuverlässig (vgl. 3.5.3). Darüber hinaus wurden die Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzsignale vor allem in den Kompartimenten detektiert, die dem jeweiligen Bestimmungsort der verwendeten Varianten entsprachen (vgl. 3.5.3). Wie in HEK293-Zellen gab es auch in Neuronen Unterschiede bzgl. der Dauer zwischen dem Beginn der Stimulation und der Signaldetektion durch die verschiedenen Indikatoren. Hier wurden Signale am schnellsten durch Fluo-4 detektiert (Tab. 4-1).

Tab. 4-1: Dauer bis zur Ca^{2+} Signal Detektion in Neuronen durch verschiedene Ca^{2+} Indikatoren

Indikator	Signaldetektion nach
Fluo-4	6 s
cytGCaMP3.0	13 s
nucGCaMP3.0	15 s
pmGCaMP3.0	11 s

Dass Ca^{2+} Signale in Neuronen mit GCaMP3.0 langsamer detektiert werden als mit Fluo-4, entspricht jedoch dem aktuellen Stand der Forschung (Akerboom et al., 2012). Bei den Sensorvarianten reagiert das Protein, das mit der Plasmamembran assoziiert ist, am schnellsten. Das Signal ist auf einen kleinen Bereich der Plasmamembran beschränkt (vgl. Abb 3-26D), in die spannungsabhängigen Kanäle den Ca^{2+} Einstrom bewirken. Am zweitschnellsten wird das Signal durch cytGCaMP3.0 angezeigt, gefolgt von nucGCaMP3.0. Die zeitliche Abfolge der Fluoreszenzsignaldetektion entspricht genau dem Weg der Ausbreitung des Ca^{2+} Signals von der Plasmamembran bis zum Kern und unterstreicht, dass das *Targeting* von GECI an spezifische Orte in der Zelle eine vielversprechende Methode ist, die zeitliche Dynamik von Ca^{2+} Signalen zu untersuchen.

4.4 Ausblick

Die experimentelle Aufklärung der zeitlichen und räumlichen Ca^{2+} Dynamik ist die Grundvoraussetzung für ein besseres Verständnis der Art und Weise, wie dieser sekundäre Botenstoff zelluläre Funktionen beeinflusst. In vielen physiologischen Prozessen spielen gerade lokale Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eine Schlüsselrolle. Die optische Darstellung solcher Ca^{2+} Signale mit spezifisch lokalisierten Ca^{2+} Sensorvarianten, wie sie in dieser Arbeit hergestellt wurden, wird dazu beitragen das Wissen über die molekulare Wirkweise zellulärer Signalprozesse weiter zu vertiefen. Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang Prozesse der neuronalen Signalverarbeitung. Abgesehen von Experimenten in Primärzellkulturen neuronalen Ursprungs oder organotypischen Schnittpräparaten wird die Rolle von Ca^{2+} Signalen immer häufiger direkt durch die Kopplung von Imaging- und Verhaltensexperimenten am lebenden Tier untersucht (z.B. Chiappe et al., 2010; Huber et al., 2012; Tian et al., 2009).

Die Expression von GECIs im zentralen Nervensystem von Säugetieren durch konventionelle Transfektionsmethoden gestaltet sich jedoch schwierig. Als attraktive Alternativmethoden wurden in jüngerer Vergangenheit verschiedene virale Transduktionsverfahren etabliert. Die rAAV vermittelte Expression von Transgenen ist robust und bleibt über lange Zeiträume hinweg erhalten. Darüber hinaus kann man durch die Wahl des AAV-Serotypen beeinflussen, welche Zelltypen im Gehirn bevorzugt transduziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei der Transduktion von kortikalen Primärkulturen aus der Ratte mit rAAV-6 gute Ergebnisse erzielt. Allerdings wurden nicht nur Neuronen sondern auch teilweise Gliazellen transduziert. Diese Limitation kann jedoch durch den Einsatz zellspezifischer Promotoren wie z.B. den Synapsin (hSyn1)-Promotor (neuronenspezifisch), oder den GFAP Promotor (gliaspezifisch) überwunden werden

5 Literaturverzeichnis

- Adelstein, R. S. and Eisenberg, E. (1980) Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction. *Annu Rev Biochem* 49:921-956.
- Akerboom, J., Chen, T. W., Wardill, T. J., Tian, L., Marvin, J. S., Mutlu, S., Calderon, N. C., Esposti, F., Borghuis, B. G., Sun, X. R., Gordus, A., Orger, M. B., Portugues, R., Engert, F., Macklin, J. J., Filosa, A., Aggarwal, A., Kerr, R. A., Takagi, R., Kracun, S., Shigetomi, E., Khakh, B. S., Baier, H., Lagnado, L., Wang, S. S., Bargmann, C. I., Kimmel, B. E., Jayaraman, V., Svoboda, K., Kim, D. S., Schreiter, E. R., and Looger, L. L. (2012) Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging. *J Neurosci* 32:13819-13840.
- Akerboom, J., Rivera, J. D. V., Guilbe, M. a. M. R., Malavé, E. C. A., Hernandez, H. H., Tian, L., Hires, S. A., Marvin, J. S., Looger, L. L., and Schreiter, E. R. (2009) Crystal Structures of the GCaMP Calcium Sensor Reveal the Mechanism of Fluorescence Signal Change and Aid Rational Design. *Journal of Biological Chemistry* 284:6455-6464.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2008) *Molecular Biology of The Cell*. 5th:
- Atchison, R. W., Casto, B. C., and Hammon, W. M. (1965) Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* 149:754-756.
- Atchison, R. W., Casto, B. C., and Hammon, W. M. (1966) Electron microscopy of adenovirus-associated virus (AAV) in cell cultures. *Virology* 29:353-357.
- Baird, G. S., Zacharias, D. A., and Tsien, R. Y. (1999) Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:11241-11246.

- Balfanz, S., Strünker, T., Frings, S., and Baumann, A. (2005) A family of octapamine receptors that specifically induce cyclic AMP production or Ca^{2+} release in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neurochemistry* 93:440-451.
- Baughman, J. M., Perocchi, F., Girgis, H. S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C. A., Sancak, Y., Bao, X. R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R. L., Koteliansky, V., and Mootha, V. K. (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476:341-345.
- Bengtson, C. P. and Bading, H. (2012) Nuclear Calcium Signaling. 970:377-405.
- Berns, K. I., Kotin, R. M., and Labow, M. A. (1988) Regulation of adeno-associated virus DNA replication. *Biochim. Biophys. Acta* 951:425-429.
- Berridge, M. J. (2006) Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium* 40:405-412.
- Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11-21.
- Bootman, M. D., Lipp, P., and Berridge, M. J. (2001) The organisation and functions of local Ca^{2+} signals. *Journal of Cell Science* 114:2213-2222.
- Borghuis, B. G., Tian, L., Xu, Y., Nikonov, S. S., Vardi, N., Zemelman, B. V., and Looger, L. L. (2011) Imaging light responses of targeted neuron populations in the rodent retina. *J Neurosci.* 31:2855-2867.
- Brister, J. R. and Muzyczka, N. (2000) Mechanism of Rep-mediated adeno-associated virus origin nicking. *J Virol.* 74:7762-7771.
- Chalasani, S. H., Chronis, N., Tsunozaki, M., Gray, J. M., Ramot, D., Goodman, M. B., and Bargmann, C. I. (2007) Dissecting a circuit for olfactory behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 450:63-70.

- Chen, C. and Okayama, H. (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7:2745-2752.
- Chen, M., Wang, Y., Hou, T., Zhang, H., Qu, A., and Wang, X. (2011) Differential mitochondrial calcium responses in different cell types detected with a mitochondrial calcium fluorescent indicator, mito-GCaMP2. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 43:822-830.
- Chiappe, M. E., Seelig, J. D., Reiser, M. B., and Jayaraman, V. (2010) Walking Modulates Speed Sensitivity in *Drosophila* Motion Vision. *Current Biology* 20:1470-1475.
- Clapham, D. E. (2007) Calcium Signaling. *Cell* 131:1047-1058.
- Claro, E., Garcia, A., and Picatoste, F. (1989) Carbachol and histamine stimulation of guanine-nucleotide-dependent phosphoinositide hydrolysis in rat brain cortical membranes. *Biochem. J.* 261:29-35.
- Csordas, G., Varnai, P., Golenar, T., Roy, S., Purkins, G., Schneider, T. G., Balla, T., and Hajnoczky, G. (2010) Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol Cell* 39:121-132.
- De Backer, M. D., Loonen, I., Verhasselt, P., Neefs, J. M., and Luyten, W. H. (1998) Structure of the human histamine H1 receptor gene. *Biochem. J.* 335 (Pt 3):663-670.
- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabo, I., and Rizzuto, R. (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476:336-340.
- Del Bene, F., Wyart, C., Robles, E., Tran, A., Looger, L., Scott, E. K., Isacoff, E. Y., and Baier, H. (2010) Filtering of Visual Information in the Tectum by an Identified Neural Circuit. *Science* 330:669-673.

- Dombeck, D. A., Harvey, C. D., Tian, L., Looger, L. L., and Tank, D. W. (2010) Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation. *Nat Neurosci* 13:1433-1440.
- Edelman, A. M., Takio, K., Blumenthal, D. K., Hansen, R. S., Walsh, K. A., Titani, K., and Krebs, E. G. (1985) Characterization of the calmodulin-binding and catalytic domains in skeletal muscle myosin light chain kinase. *Journal of Biological Chemistry* 260:11275-11285.
- Ferkey, D. M., Hyde, R., Haspel, G., Dionne, H. M., Hess, H. A., Suzuki, H., Schafer, W. R., Koelle, M. R., and Hart, A. C. (2007) *C. elegans* G protein regulator RGS-3 controls sensitivity to sensory stimuli. *Neuron* 53:39-52.
- Fetcho, J. R., Cox, K. J., and O'Malley D.M. (1998) Monitoring activity in neuronal populations with single-cell resolution in a behaving vertebrate. *Histochem J* 30:153-167.
- Filippin, L., Abad, M. C., Gastaldello, S., Magalhães, P. J., Sandoz, D., and Pozzan, T. (2005) Improved strategies for the delivery of GFP-based Ca^{2+} sensors into the mitochondrial matrix. *Cell Calcium* 37:129-136.
- Franzini-Armstrong, C. (2007) ER-Mitochondria Communication. How Privileged? *Physiology* 22:261-268.
- Gee, K. R., Brown, K. A., Chen, W. N. U., Bishop-Stewart, J., Gray, D., and Johnson, I. (2000) Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca^{2+} -indicator dyes. *Cell Calcium* 27:97-106.
- Giacomello, M., Drago, I., Bortolozzi, M., Scorzeto, M., Gianelle, A., Pizzo, P., and Pozzan, T. (2010) Ca^{2+} hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca^{2+} mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca^{2+} channels. *Mol Cell* 38:280-290.

- Girod, A., Ried, M., Wobus, C., Lahm, H., Leike, K., Kleinschmidt, J., Deleage, G., and Hallek, M. (1999) Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nat Med.* 5:1052-1056.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry* 260:3440-3450.
- Gudermann, T., Kalkbrenner, F., and Schultz, G. (1996) Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu. Rev Pharmacol. Toxicol.* 36:429-459.
- Gudermann, T., Schoneberg, T., and Schultz, G. (1997) Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu. Rev Neurosci.* 20:399-427.
- Hancock, J. F., Cadwallader, K., Paterson, H., and Marshall, C. J. (1991) A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *The EMBO Journal* 10:4033-4039.
- Hartley, J. and Rowe, W. (1960) A new mouse virus apparently related to the adenovirus group. *Virology* 11:645-647.
- Hasan, M. T., Friedrich, R. W., Euler, T., Larkum, M. E., Giese, G., Both, M., Duebel, J., Waters, J., Bujard, H., Griesbeck, O., Tsien, R. Y., Nagai, T., Miyawaki, A., and Denk, W. (2004) Functional fluorescent Ca^{2+} indicator proteins in transgenic mice under TET control. *PLoS. Biol* 2
- He, J., Ma, L., Kim, S., Nakai, J., and Yu, C. R. (2008) Encoding gender and individual information in the mouse vomeronasal organ. *Science* 320:535-538.
- Heim, N. and Griesbeck, O. (2004) Genetically encoded indicators of cellular calcium dynamics based on troponin C and green fluorescent protein. *J Biol Chem.* 279:14280-14286.

- Higgins, E. R., Cannell, M. B., and Sneyd, J. (2006) A buffering SERCA pump in models of calcium dynamics. *Biophys. J.* 91:151-163.
- Hires, S. A., Tian, L., and Looger, L. L. (2008) Reporting neural activity with genetically encoded calcium indicators. *Brain Cell Biol* 36:69-86.
- Hoggan, M. D., Blacklow, N. R., and ROWE, W. P. (1966) Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 55:1467-1474.
- Horikawa, K., Yamada, Y., Matsuda, T., Kobayashi, K., Hashimoto, M., Matsu-ura, T., Miyawaki, A., Michikawa, T., Mikoshiba, K., and Nagai, T. (2010) Spontaneous network activity visualized by ultrasensitive Ca^{2+} indicators, yellow Cameleon-Nano. *Nat Methods* 7:729-732.
- Huber, D., Gutnisky, D. A., Peron, S., Connor, D. H., Wiegert, J. S., Tian, L., Oertner, T. G., Looger, L. L., and Svoboda, K. (2012) Multiple dynamic representations in the motor cortex during sensorimotor learning. *Nature* 484:473-478.
- Jensen, T. P., Buckby, L. E., and Empson, R. M. (2004) Expression of plasma membrane Ca^{2+} ATPase family members and associated synaptic proteins in acute and cultured organotypic hippocampal slices from rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 152:129-136.
- Ji, G., Feldman, M. E., Deng, K. Y., Greene, K. S., Wilson, J., Lee, J. C., Johnston, R. C., Rishniw, M., Tallini, Y., Zhang, J., Wier, W. G., Blaustein, M. P., Xin, H. B., Nakai, J., and Kotlikoff, M. I. (2004) Ca^{2+} -sensing transgenic mice: postsynaptic signaling in smooth muscle. *J Biol Chem.* 279:21461-21468.
- Jutel, M., Blaser, K., and Akdis, C. A. (2006) Histamine receptors in immune regulation and allergen-specific immunotherapy. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 26:245-59, vii.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., and Smith, A. E. (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39:499-509.

- Kamm, K. E. and Stull, J. T. (1985) The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol. Toxicol.* 25:593-620.
- Kanaji, S., Iwahashi, J., Kida, Y., Sakaguchi, M., and Mihara, K. (2000) Characterization of the signal that directs Tom20 to the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.* 151:277-288.
- Kindt, K. S., Quast, K. B., Giles, A. C., De, S., Hendrey, D., Nicastro, I., Rankin, C. H., and Schafer, W. R. (2007) Dopamine mediates context-dependent modulation of sensory plasticity in *C. elegans*. *Neuron* 55:662-676.
- Kotin, R. M., Menninger, J. C., Ward, D. C., and Berns, K. I. (1991) Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics* 10:831-834.
- Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44:283-292.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lechleiter, J., Girard, S., Peralta, E., and Clapham, D. (1991) Spiral calcium wave propagation and annihilation in *Xenopus laevis* oocytes. *Science* 252:123-126.
- Llopis, J., McCaffery, J. M., Miyawaki, A., Farquhar, M. G., and Tsien, R. Y. (1998) Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:6803-6808.
- Lovenberg, T. W., Roland, B. L., Wilson, S. J., Jiang, X., Pyati, J., Huvar, A., Jackson, M. R., and Erlander, M. G. (1999) Cloning and Functional Expression of the Human Histamine H3 Receptor. *Molecular Pharmacology* 55:1101-1107.

- Lusby, E., Fife, K. H., and Berns, K. I. (1980) Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. *J Virol.* 34:402-409.
- Mandel, M. and Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53:159-162.
- Mank, M., Reiff, D. F., Heim, N., Friedrich, M. W., Borst, A., and Griesbeck, O. (2006) A FRET-based calcium biosensor with fast signal kinetics and high fluorescence change. *Biophys. J* 90:1790-1796.
- Mank, M., Santos, A. F., Drenth, S., Mersic-Flogel, T. D., Hofer, S. B., Stein, V., Hendel, T., Reiff, D. F., Levelt, C., Borst, A., Bonhoeffer, T., Hubener, M., and Griesbeck, O. (2008) A genetically encoded calcium indicator for chronic in vivo two-photon imaging. *Nat Methods* 5:805-811.
- Mao, T., O'Connor, D. H., Scheuss, V., Nakai, J., and Svoboda, K. (2008) Characterization and subcellular targeting of GCaMP-type genetically-encoded calcium indicators. *PLoS. One.* 3:e1796-
- McCarty, D. M., Monahan, P. E., and Samulski, R. J. (2001) Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther.* 8:1248-1254.
- Meador, W. E., Means, A. R., and Quirocho, F. A. (1992) Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 Å structure of a calmodulin-peptide complex. *Science* 257:1251-1255.
- Meisenberg, A. (2010) Monitoring spatial and temporal dynamics of the second messenger Ca^{2+} using a genetically encoded sensor protein.
- Meyer, T. S. and Lamberts, B. L. (1965) Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta* 107:144-145.

- Miyawaki, A., Griesbeck, O., Heim, R., and Tsien, R. Y. (1999) Dynamic and quantitative Ca^{2+} measurements using improved cameleons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:2135-2140.
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., and Tsien, R. Y. (1997) Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 388:882-887.
- Monahan, P. E. and Samulski, R. J. (2000) Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons? *Mol Med. Today* 6:433-440.
- Mori, M., Konno, T., Ozawa, T., Murata, M., Imoto, K., and Nagayama, K. (2000) Novel interaction of the voltage-dependent sodium channel (VDSC) with calmodulin: does VDSC acquire calmodulin-mediated Ca^{2+} -sensitivity? *Biochemistry* 39:1316-1323.
- Nagai, T., Sawano, A., Park, E. S., and Miyawaki, A. (2001) Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca^{2+} . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:3197-3202.
- Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K. (2001) A high signal-to-noise Ca^{2+} probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol.* 19:137-141.
- Nguyen, M., Millar, D. G., Yong, V. W., Korsmeyer, S. J., and Shore, G. C. (1993) Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J. Biol. Chem.* 268:25265-25268.
- Ohkura, M., Matsuzaki, M., Kasai, H., Imoto, K., and Nakai, J. (2005) Genetically encoded bright Ca^{2+} probe applicable for dynamic Ca^{2+} imaging of dendritic spines. *Anal. Chem.* 77:5861-5869.
- Palmer, A. E., Giacomello, M., Kortemme, T., Hires, S. A., Lev-Ram, V., Baker, D., and Tsien, R. Y. (2006) Ca^{2+} indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem. Biol* 13:521-530.

- Parker, I. and Yao, Y. (1991) Regenerative release of calcium from functionally discrete subcellular stores by inositol trisphosphate. *Proc. Biol Sci.* 246:269-274.
- Pearson, W. R., Wood, T., Zhang, Z., and Miller, W. (1997) Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics* 46:24-36.
- Petreaanu, L., Gutnisky, D. A., Huber, D., Xu, N. I., Connor, D. H., Tian, L., Looger, L., and Svoboda, K. (2012) Activity in motor-sensory projections reveals distributed coding in somatosensation. *Nature* 489:299-303.
- Pizzo, P., Drago, I., Filadi, R., and Pozzan, T. (2012) Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis: mechanism, role, and tissue specificities. *Pflügers Arch.* 464:3-17.
- Pizzo, P. and Pozzan, T. (2007) Mitochondria–endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics. *Trends in Cell Biology* 17:511-517.
- Reiff, D. F., Ihring, A., Guerrero, G., Isacoff, E. Y., Joesch, M., Nakai, J., and Borst, A. (2005) In vivo performance of genetically encoded indicators of neural activity in flies. *J Neurosci.* 25:4766-4778.
- Rhee, S. G. and Bae, Y. S. (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol Chem.* 272:15045-15048.
- Rizzuto, R., Brini, M., Pizzo, P., Murgia, M., and Pozzan, T. (1995) Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. *Curr. Biol.* 5:635-642.
- Rizzuto, R. and Pozzan, T. (2006) Microdomains of Intracellular Ca^{2+} : Molecular Determinants and Functional Consequences. *Physiological Reviews* 86:369-408.

- Royo, N. C., Vandenberghe, L. H., Ma, J. Y., Hauspurg, A., Yu, L., Maronski, M., Johnston, J., Dichter, M. A., Wilson, J. M., and Watson, D. J. (2008) Specific AAV serotypes stably transduce primary hippocampal and cortical cultures with high efficiency and low toxicity. *Brain Research* 1190:15-22.
- Sabatini, B. L., Oertner, T. G., and Svoboda, K. (2002) The Life Cycle of Ca^{2+} Ions in Dendritic Spines. *Neuron* 33:439-452.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd:
- Seelig, J. D., Chiappe, M. E., Lott, G. K., Dutta, A., Osborne, J. E., Reiser, M. B., and Jayaraman, V. (2010) Two-photon calcium imaging from head-fixed *Drosophila* during optomotor walking behavior. *Nat Meth* 7:535-540.
- Shigetomi, E., Bushong, E. A., Hausteiner, M. D., Tong, X., Jackson-Weaver, O., Kracun, S., Xu, J., Sofroniew, M. V., Ellisman, M. H., and Khakh, B. S. (2013) Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. *J Gen. Physiol* 141:633-647.
- Shigetomi, E., Kracun, S., and Khakh, B. S. (2010) Monitoring astrocyte calcium microdomains with improved membrane targeted GCaMP reporters. *Neuron Glia Biol* 6:183-191.
- Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G. W., Kobayashi, T., Stevens, R. C., and Iwata, S. (2011) Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature* 475:65-70.
- Skene, J. H. and Virag, I. (1989) Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43. *J. Cell Biol.* 108:613-624.

- Suh, G. S., Wong, A. M., Hergarden, A. C., Wang, J. W., Simon, A. F., Benzer, S., Axel, R., and Anderson, D. J. (2004) A single population of olfactory sensory neurons mediates an innate avoidance behaviour in *Drosophila*. *Nature* 431:854-859.
- Suzuki, H., Kerr, R., Bianchi, L., Frokjaer-Jensen, C., Slone, D., Xue, J., Gerstbrein, B., Driscoll, M., and Schafer, W. R. (2003) In vivo imaging of *C. elegans* mechanosensory neurons demonstrates a specific role for the MEC-4 channel in the process of gentle touch sensation. *Neuron* 39:1005-1017.
- Tallini, Y. N., Ohkura, M., Choi, B. R., Ji, G., Imoto, K., Doran, R., Lee, J., Plan, P., Wilson, J., Xin, H. B., Sanbe, A., Gulick, J., Mathai, J., Robbins, J., Salama, G., Nakai, J., and Kotlikoff, M. I. (2006) Imaging cellular signals in the heart in vivo: Cardiac expression of the high-signal Ca^{2+} indicator GCaMP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:4753-4758.
- Tian, L., Hires, S. A., and Looger, L. L. (2012) Imaging neuronal activity with genetically encoded calcium indicators. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2012:647-656.
- Tian, L., Hires, S. A., Mao, T., Huber, D., Chiappe, M. E., Chalasani, S. H., Petreanu, L., Akerboom, J., McKinney, S. A., Schreiter, E. R., Bargmann, C. I., Jayaraman, V., Svoboda, K., and Looger, L. L. (2009) Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators. *Nat Meth* 6:875-881.
- Tsien, R. Y. (1981) A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290:527-528.
- Tsien, R. Y. (1999) Monitoring cell calcium. 28-54.
- Tsien, R. and Pozzan, T. (1989) [14] Measurement of cytosolic free Ca^{2+} with quin2. Volume 172:230-262.
- Vetter, I. and Lewis, R. J. (2010) Characterization of endogenous calcium responses in neuronal cell lines. *Biochemical Pharmacology* 79:908-920.

- Walsh, C., Barrow, S., Voronina, S., Chvanov, M., Petersen, O. H., and Tepikin, A. (2009) Modulation of calcium signalling by mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1787:1374-1382.
- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., and Gatto, G. J. (2005) Posttranslationale Proteinmodifikation: die Chemie der Proteomdiversifizierung. *Angewandte Chemie* 117:7508-7539.
- Wang, J. W., Wong, A. M., Flores, J., Vossell, L. B., and Axel, R. (2003) Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain. *Cell* 112:271-282.
- Wang, Q., Shui, B., Kotlikoff, M. I., and Söndermann, H. (2008) Structural Basis for Calcium Sensing by GCaMP2. *Structure* 16:1817-1827.
- Woods, N. M., Cuthbertson, K. S., and Cobbold, P. H. (1986) Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. *Nature* 319:600-602.
- Xiao, X., Li, J., and Samulski, R. J. (1998) Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol.* 72:2224-2232.
- Yamashita, M., Fukui, H., Sugama, K., Horio, Y., Ito, S., Mizuguchi, H., and Wada, H. (1991) Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88:11515-11519.
- Yuste, R., Peinado, A., and Katz, L. C. (1992) Neuronal domains in developing neocortex. *Science* 257:665-669.
- Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C., and Tsien, R. Y. (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 296:913-916.

- Zhao, Y., Araki, S., Wu, J., Teramoto, T., Chang, Y. F., Nakano, M., Abdelfattah, A. S., Fujiwara, M., Ishihara, T., Nagai, T., and Campbell, R. E. (2011) An expanded palette of genetically encoded Ca^{2+} indicators. *Science* 333:1888-1891.
- Zhou, X. and Muzyczka, N. (1998) In vitro packaging of adeno-associated virus DNA. *J Virol.* 72:3241-3247.
- Zlatkine, P., Mehul, B., and Magee, A. I. (1997) Retargeting of cytosolic proteins to the plasma membrane by the Lck protein tyrosine kinase dual acylation motif. *Journal of Cell Science* 110:673-679.
- Zuber, M. X., Strittmatter, S. M., and Fishman, M. C. (1989) A membrane-targeting signal in the amino terminus of the neuronal protein GAP-43. *Nature* 341:345-348.

6 Anhang

6.1 Verwendete Primer

Alle hier aufgelisteten Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

Tab. 6-1: Primer zur Klonierung spezifisch lokalisierter GCaMP3.0 Varianten

Gen	Teilseq.	Primer #	Primersequenz 5' → 3'
GCaMP3.0	forward	5061	AATTTCTAGACCACCATGATGGGTTCTCATC
GCaMP3.0	reverse	5057	GTCGGATCCGCTCACTTCGCTGTCATC
GCaMP3.0-CaaX	3'-a	5053	GCACTTGACGACATGCAACCCTTCGCTGTCATC ATTTGTAC
	3'-b	5054	AATTGGATCCGAATTCCTACGACAGCACGCACTT GCACGACATGCAAC
GCaMP3.0-10aa-CaaX	3'-a	5105	GCAACCACCAGCACTACCAGCACTACCAGCACTA TCACCCCTTCGCTGTCATCATTTGTAC
	3'-b	5106	AATTGGATCCTCACGACAGCACGCACTTGCACGA CATGCAACCACCAGCACTACCAG
GCaMP3-28aa-CaaX	3'-a	5102	GCAGTTCTCACACACGTCAATGTTCTCCATCCAGT CATCGCAACCCTTCGCTGTCATCATTTGTAC
	3'-b	5103	GGCGAGATCCGGTGGATCAATTCGAAGCTTCGGC GGGGGATAATGGCAGTTCTCACACACGTCAATG
	3'-c	5104	AATTGGATCCCTACGACAGCACGCACTTGCACGA CATGCAACCCGTGGCGAGATCCGGTGGATC
pmGCaMP3.0 (GAP4328aa)	5'-a	5187	TCCCCCGCCGAAGCTTCGAATTGATCCACCGGAT CTCGCCACCATGGGTTCTCATCATCATCATC
	5'-b	5188	GATGACTGGATGGAGAACATTGACGTGTGTGAGA ACTGCCATTATCCCCCGCCGAAGCTTCG
	5'-c	5189	AAGAACCAAACAGGTTGAAAAGAATGATGAGGA CCAAAAGATCGATGACTGGATGGAGAACATTG
	5'-d	5154	AATTGGATCCACCATGCTGTGCTGTATGAGAAGA ACCAAACAGGTTGAAAAGAATGAT
mtGCaMP3.0	5'-a	5099	GCCAAGATCCATTCGTTGGGCGATCCACCGGTCG CCACGATGGGTTCTCATCATCATCATC
	5'-b	5100	CTGCGGGGCTTGACAGGCTCGGCCCGGCGGCTCC CAGTGCCGCGCGCCAAGATCCATTCGTTGGGC

Gen	Teilseq.	Primer #	Primersequenz 5' → 3'
mtGCaMP3.0	5'-c	5101	AATTTCTAGACCACCATGTCCGTCCTGACGCCGC TGCTGCTGCGGGGCTTGACAGGC
momGCaMP3.0	5'-a	5096	GGTACTGCATCTACTTCGACCGCAAAAGACGAAG TGACCCCAACATGGGTTCTCATCATCATCATC
	5'-b	5097	CATCGCCGCCGGTGTATGCGGGGCCCTTTTCATT GGGTACTGCATCTACTTCGAC
	5'-c	5098	AATTTCTAGACCACCAATGGTGGGTGCGAACAGC GCCATCGCCGCCGGTGTATGC
golgiGCaMP3.0	5'-a	5065	GCCTGCATCACGCTCGGCGCCTACCTCGGCCATA AGATGATGGGTTCTCATCATCATC
	5'-b	5066	AATTTCTAGACCACCATGAAGACGTTACTCTCCC TCGCCCTCGTCGGCGCCTGCATCACGCTCGGC
Lck-GCaMP3.0	5'-a	5093	TATCCCCCGCCGAAGCTTCGAATTGATCCACCGG ATCTCGCCACGATGGGTTCTCATCATCATCATC
	5'-b	5094	GAAGATGACTGGATGGAGAACATTGACGTGTGTG AGAACTGCCATTATCCCCCGCCGAAGCTTC
	5'-c	5095	AATTTCTAGACCACCTATGGGCTGTGGCTGCAGC TCAAACCCTGAAGATGACTGGATGGAGAAC

Teilsq. = Teilsequenz

Tab. 6-2: Liste der Primer für die sqPCR

Gen	Primer #	Primersequenz 5' → 3'	Fragmentlänge [B]
HRH1	5140	CATCTTCTTCATGGTCATTGCC	144
	5141	TTGAATGTCTTCTTGAAGTTCTC	
HRH3	5142	CTCGCCATCTCCGACTTCC	481
	5145	GCGCCTCTGGATGTTTCAGG	
Aktin	4690	CCTGCGTCTGGACCTGGCTGG	554
	4691	GCTTGCTGATCCACATCTGCTGG	

Tab. 6-3: Standardfragmente und Primersequenzen zur rAAV Titerbestimmung mittels qPCR

Template	Primer #	Primersequenz 5'→3'	Fragmentlänge [B]
CMV-Promotor	5034	CGCTATTACCATGGTGATGCG	200
	5035	CCTCCCACCGTACACGCC	

6.2 Sequenzen

Tab. 6-4: Übersicht der Lokalisierungsmotive der in dieser Arbeit verwendeten GCaMP3.0 Varianten

Zielort	Lokalisierungssequenz	Terminus	Ursprung der Sequenz	Literatur
pm	GCMSCKCVLS	C	HRas Membrananker	Hancock et al., 1991;
	MGCGCSSNPED	N	Lck-Membrananker	Zlatkine et al., 1997
	MLCCMRRTKQVEKN DEQKI	N	GAP43-Membrananker	Skene and Virag, 1989; Zuber et al., 1989
mt	MSVLTPPLLLRGLTGS ARRLPVPRAKIHSLGD PPVA	N	Importsignal der COXVII zur Translokation in die mitochondriale Matrix	Rizzuto et al., 1989; Rizzuto et al., 1995
mom	MVGRNSAIAAGVCG ALFIGYCIYFDRKRRS DPN	N	Transmembrandomäne von TOM20	Kanaji et al., 2000
golgi	KTLLSLALVGACITLG AYLGHK	N	C-terminaler Membrananker von Bcl-2	Nguyen et al., 1993
nuc	PKKKRKV	N	Nukleus Lokalisationssignal des SV40 <i>large T-antigen</i>	Kalderon et al., 1984

pm = Plasmamembran; mt = mitochondriale Matrix; mom = Mitochondriale Außenmembran;
golgi = Golgi-Apparat; nuc = Nukleus

6.2.1 Sequenz von GCaMP3.0-CaaX

```

001  AGATCTCTAGACCAACATGATGGTTCTCATCATCATCATCATCATGTTATGGCTAGCATGACTGGTGACAGCAAAATGGGTCGGGATCTGTACGACGAT
101  GACGATAAGGATCTCGCCACCATGGTCGACTCATCACGTCGTAAGTGAATAAGACAGGTCACGCAGTCAGAGCTATAGGTCGGCTGAGCTCACTCGAGA
201  ACGTCTATATCAAGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCGTGCAGCTCGCCTACCACTA
301  CCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCGTGCAGTCCAAACTTTCGAAAGACCCCAACGAGAAGCGC
401  GATCACATGGTCTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGCGGTACCGGAGGGAGCATGGTGAGCAAGG
501  GCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGTGAGGGCGATGC
601  CACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCAACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGC
701  TTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACATCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACG
801  GCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCT
901  GGGGCACAAGCTGGAGTACAACACGCGTGACCAACTGACTGAAGAGCAGATCGCAGAATTTAAAGAGGCTTTCTCCCTATTGACAAGGACGGGGATGGG
1001 ACAATAACAACCAAGGAGCTGGGGACGGTGATGCGGTCTCTGGGGCGAAGCCCAAGAGCTGCAGGACATGATCAATGAAGTAGATGCCGACG
1101 GTGACGGCACAAATCGACTTCCCTGAGTTCCTGACAATGATGGCAAGAAAAATGAAAGACACAGACAGTGAAGAAGAAATTAGAGAAGCGTTCCGTGTGTT
1201 TGATAAGGATGGCAATGGCTACATCAGTGCAGCAGAGCTTCGCCACGTGATGACAAACCTTGAGAGAGAAGTTAACAGATGAAGAGGTTGATGAAATGATC
1301 AGGGAAGCAGACATCGATGGGGATGGTCAGGTAACTACGAAGAGTTTGTACAAATGATGACAGCGAAGGGTTGCATGTCGTGCAAGTGCGTGCTGCTGCTG
1401 AGGAATTCGGATCC

```

6.2.2 Sequenz von GCaMP3.0-10aa-CaaX

```

001  AGATCTCTAGACCAACATGATGGTTCTCATCATCATCATCATCATGTTATGGCTAGCATGACTGGTGACAGCAAAATGGGTCGGGATCTGTACGACGAT
101  GACGATAAGGATCTCGCCACCATGGTCGACTCATCACGTCGTAAGTGAATAAGACAGGTCACGCAGTCAGAGCTATAGGTCGGCTGAGCTCACTCGAGA
201  ACGTCTATATCAAGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCGTGCAGCTCGCCTACCACTA
301  CCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCGTGCAGTCCAAACTTTCGAAAGACCCCAACGAGAAGCGC
401  GATCACATGGTCTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGCGGTACCGGAGGGAGCATGGTGAGCAAGG
501  GCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGTGAGGGCGATGC
601  CACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCAACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGC
701  TTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACATCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACG
801  GCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCT
901  GGGGCACAAGCTGGAGTACAACACGCGTGACCAACTGACTGAAGAGCAGATCGCAGAATTTAAAGAGGCTTTCTCCCTATTGACAAGGACGGGGATGGG
1001 ACAATAACAACCAAGGAGCTGGGGACGGTGATGCGGTCTCTGGGGCGAAGCCCAAGAGCTGCAGGACATGATCAATGAAGTAGATGCCGACG
1101 GTGACGGCACAAATCGACTTCCCTGAGTTCCTGACAATGATGGCAAGAAAAATGAAAGACACAGACAGTGAAGAAGAAATTAGAGAAGCGTTCCGTGTGTT
1201 TGATAAGGATGGCAATGGCTACATCAGTGCAGCAGAGCTTCGCCACGTGATGACAAACCTTGAGAGAGAAGTTAACAGATGAAGAGGTTGATGAAATGATC
1301 AGGGAAGCAGACATCGATGGGGATGGTCAGGTAACTACGAAGAGTTTGTACAAATGATGACAGCGAAGGGTGATAGTGCTGGTAGTGCTGGTAGTGCTG
1401 GTGGTTGCATGTCGTGCAAGTGCGTGCTGCTGCTGAGGATCC

```

6.2.3 Sequenz von GCaMP3.0-28aa-CaaX

```

001  AGATCTCTAGACCAACATGATGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGACAGCAAAATGGGTCGGGATCTGTACGACGAT
101  GACGATAAGGATCTCGCCACCATGGTCGACTCATCACGTCGTAAGTGAATAAGACAGGTCACGCAGTCAGAGCTATAGGTCGGCTGAGCTCACTCGAGA
201  ACGTCTATATCAAGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGCGTGCAGCTCGCCTACCACTA
301  CCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCGTGCAGTCCAACTTTCGAAAGACCCCAACGAGAAGCGC
401  GATCACATGGTCTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGCGGTACCGGAGGGAGCATGGTGAGCAAGG
501  GCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGTGAGGGCGATGC
601  CACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGAGTGC
701  TTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACATCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACG
801  GCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGACGGCAACATCCT
901  GGGGCACAAGCTGGAGTACAACACGCGTGACCAACTGACTGAAGAGCAGATCGCAGAATTTAAAGAGGCTTTCTCCCTATTGACAAGGACGGGGATGGG
1001 ACAATAACAACCAAGGAGCTGGGGACGGTGATGCGGTCTCTGGGGCAGAACCCCAAGAGAGCTGCAGGACATGATCAATGAAGTAGATGCCGACG
1101 GTGACGGCACAACTCGACTTCCCTGAGTTCCTGACAATGATGGCAAGAAAAATGAAAGACACAGACAGTGAAGAAGAAATTAGAGAAGCGTTCCGTGTGTT
1201 TGATAAGGATGGCAATGGCTACATCAGTGCAGCAGAGCTTCGCCACGTGATGACAAACCTTGAGAGAGAAGTTAACAGATGAAGAGGTTGATGAAATGATC
1301 GGTTCGATGACTGGATGGAGAACATTGACGTGTGTGAGAATGCCATTATCCCCCGCCGAAGCTTCGAATTGATCCACCGGATCTCGCCACGGGTGCA
1401 TGTCGTGCAAGTGCGTGTCTGTAGGGATCC

```

6.2.4 Sequenz von GAP43-28aa-GCaMP3.0 (pmGCaMP3.0)

```

001  GGATCCACCATGCTGTGCTGTATGAGAAGAACCAACAGTTGAAAAGAAATGATGAGGACCAAAAGATCGATGACTGGATGGAGAACATTGACGTGTGTG
101  AGAACTGCCATTATCCCCCGCCGAAGCTTCGAATTGATCCACCGGATCTCGCCACCATGGGTTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGAC
201  TGGTGGACAGCAAAATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCTCGCCACCATGGTCGACTCATCACGTCGTAAGTGAATAAGACAGGTCAC
301  GCAGTCAGAGCTATAGGTCGGCTGAGCTCACTCGAGAAGCTCTATATCAAGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCGAACTTCAAGATCCGCCACA
401  ACATCGAGGACGGCGCGTGCAGCTCGCTACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCGT
501  GCAGTCCAACTTTCGAAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTG
601  TACAAGGGCGGTACCGGAGGGAGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCC
701  ACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGTGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCC
801  CACCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGAGTGCTTCAGCCGCTACCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGC
901  TACATCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGC
1001 TGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACGCGTGACCAACTGACTGAAGAGCAGATCGCAGAATTTAA
1101 AGAGGCTTTCTCCCTATTGACAAGGACGGGATGGGACAATAACAACCAAGGAGCTGGGGACGGTGATGCGGTCTCTGGGGCAGAACCCCAAGAGCA
1201 GAGCTGCAGGACATGATCAATGAAGTAGATGCCGACGGTGACGGCACAATCGACTTCCCTGAGTTCCTGACAATGATGGCAAGAAAAATGAAAGACAG
1301 ACAGTGAAGAAGAAATTAGAGAAGCGTTCCGTGTGTTTGATAAGGATGGCAATGGCTACATCAGTGCAGCAGAGCTTCGCCACGTGATGACAAACCTTGG
1401 AGAGAAGTTAACAGATGAAGAGGTTGATGAAATGATCAGGGAAGCAGACATCGATGGGGATGGTCAGGTAAACTACGAAGAGTTTGACAAATGATGACA
1501 GCGAAGTAGGGATCC

```

6.2.5 Sequenz von COXVIII-GCaMP3.0 (mtGCaMP3.0)

```

001  TCTAGACCAACCATGTCCTGCTGACGCCGCTGCTGCTGCGGGCTTGACAGGCTCGGCCCGCGGCTCCCAGTGCCGCGGCCAAGATCCATTCTGTTGGG
101  CGATCCACCGGTGCGCCACGATGGGTCTCTGTCATCATCATCATGTTATGGCTAGCATGACTGGTGACAGCAATGGGTGCGGATCTGTACGACGATGAC
201  GATAAGGATCTCGCCACCATGGTCGACTCATCAGTCGTAAGTGAATAAGACAGGTCACGCAGTCAGAGCTATAGTTCGGCTGAGCTCACTCGAGAACG
301  TCTATATCAAGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGCGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGCGTGCAGCTCGCCTACCACTACCA
401  GCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCGTGCAGTCCAACTTTCGAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGAT
501  CACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGCGGTACCGGAGGGAGCATGGTGAGCAAGGGCG
601  AGGAGCTGTTACCCGGGTGGTGCCCATCTGGTCGAGCTGGACGGCGCAGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGTGAGGGCGATGCCAC
701  CTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTC
801  AGCCGCTACCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACATCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCA
901  ACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGG
1001 GCACAAGCTGGAGTACAACACGCGTGACCAACTGACTGAAGAGCAGATCGCAGAATTTAAAGAGGCTTTCTCCCTATTTGACAAGGACGGGGATGGGACA
1101 ATAACAACCAAGGAGCTGGGGACGGTGATGCGGTCTCTGGGGCAGAACCCACAGAAGCAGAGCTGCAGGACATGATCAATGAAGTAGATGCCGACGGTG
1201 ACGGCACAATCGACTTCCCTGAGTTCCTGACAATGATGGCAAGAAAAATGAAAGACACAGACAGTGAAGAAGAAATTAGAGAAGCGTTCCGTGTGTTTGA
1301 TAAGGATGGCAATGGCTACATCAGTGCAGCAGAGCTTCGCCACGTGATGACAAACCTTGGAGAGAAGTTAACAGATGAAGAGGTTGATGAAATGATCAGG
1401 GAAGCAGACATCGATGGGGATGGTCAGGTAAACTACGAAGAGTTTGTACAAATGATGACAGCGAAGTGAGCGGATCC

```

6.2.6 Sequenz von Tom20-GCaMP3.0 (momGCaMP3.0)

```

001  TCTAGACCAACCATGGTGGGTGCGAACAGCGCCATCGCCGCCGGTGATGCGGGGCCCTTTTCATTGGGTACTGCATCTACTTCGACCGCAAAAGACGAAG
101  TGACCCCAACATGGGTCTCTGTCATCATCATCATGTTATGGCTAGCATGACTGGTGACAGCAATGGGTGCGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGAT
201  CTCGCCACCATGGTCGACTCATCAGTCGTAAGTGAATAAGACAGGTCACGCAGTCAGAGCTATAGGTCGGCTGAGCTCACTCGAGAAGCTCTATATCA
301  AGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGCGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGCGTGCAGCTCGCCTACCCTACCAGCAGAACAC
401  CCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCGTGCAGTCCAACTTTCGAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCAGTGGTC
501  CTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGCGGTACCGGAGGGAGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT
601  TCACCGGGGTGGTGCCCATCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGTGAGGGCGATGCCACCTACGGCAA
701  GCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTAC
801  CCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACATCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGA
901  CCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCT
1001 GGAGTACAACACGCGTGACCAACTGACTGAAGAGCAGATCGCAGAATTTAAAGAGGCTTTCTCCCTATTTGACAAGGACGGGGATGGGACAATAACAACC
1101 AAGGAGCTGGGGACGGTGATGCGGTCTCTGGGGCAGAACCCACAGAAGCAGAGCTGCAGGACATGATCAATGAAGTAGATGCCGACGGTGACGGCACAA
1201 TCGACTTCCCTGAGTTCCTGACAATGATGGCAAGAAAAATGAAAGACACAGACAGTGAAGAAGAAATTAGAGAAGCGTTCCGTGTGTTTATAAGGATGG
1301 CAATGGCTACATCAGTGCAGCAGAGCTTCGCCACGTGATGACAAACCTTGGAGAGAAGTTAACAGATGAAGAGGTTGATGAAATGATCAGGGAAGCAGAC
1401 ATCGATGGGGATGGTCAGGTAAACTACGAAGAGTTTGTACAAATGATGACAGCGAAGTGAGCGGATCC

```

6.2.7 Sequenz von Bcl-2-GCaMP3.0 (golgiGCaMP3.0)

```

001  TCTAGACCACCATGAAGACGTTACTCTCCCTCGCCCTCGTCGGCGCCTGCATCACGCTCGGCCTACCTCGGCCATAAGATGATGGGTTCGTCATCA
101  TCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCTCGCCACCATTGGTCGACTCATCACGT
201  CGTAAGTGGAAATAAGACAGGTCACGCAGTCAGAGCTATAGGTCGGGTGAGCTCACTCGAGAACGTCTATATCAAGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCA
301  AGGCGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGCGTGCAGCTCGCCTACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCT
401  GCCCGACAACCACTACCTGAGCGTGCAGTCCAAACTTTGAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGG
501  ATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGCGGTACCGGAGGAGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCG
601  AGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGTGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAC
701  CGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTC
801  TTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACATCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCG
901  ACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACGCGTGACCAACTGAC
1001 TGAAGAGCAGATCGCAGAATTTAAAGAGGCTTTCTCCCTATTGACAAGGACGGGATGGGACAATAACAACCAAGGAGCTGGGGACGGTGATCGCGTCT
1101 CTGGGGCAGAACCCACAGAAGCAGAGCTGCAGGACATGATCAATGAAGTAGATGCCGACGGTGACGGCACAATCGACTTCCCTGAGTTCTTGACAATGA
1201 TGGCAAGAAAAATGAAAGACACAGACAGTGAAGAAGAAATTAGAGAAGCGTTCCGTGTGTTTGATAAGGATGGCAATGGCTACATCAGTGCAGCAGAGCT
1301 TCGCCACGTGATGACAAACCTTGGAGAGAAGTTAACAGATGAAGAGGTTGATGAAATGATCAGGGAAGCAGACATCGATGGGGATGGTCAGGTAAACTAC
1401 GAAGAGTTTGTACAAATGATGACAGCGAAGTGAGCGGATCC

```

6.2.8 Sequenz von Lck-GCaMP3.0

```

001  TCTAGACCACCTATGGGCTGTGGCTGCAGCTCAAACCTGAAGATGACTGGATGGAGAACATTGACGTGTGTGAGAACTGCCATTATCCCCGCCGAAGC
101  TTCGAATTGATCCACCGGATCTCGCCACGATGGGTCTCATCATCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGGATCT
201  GTACGACGATGACGATAAGGATCTCGCCACCATTGGTCGACTCATCACGTCGTAAGTGGAAATAAGACAGGTCACGCAGTCAGAGCTATAGGTCGGCTGAGC
301  TCACCTCGAGAACGTCTATATCAAGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGCGTGCAGCTCG
401  CCTACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCGTGCAGTCCAAACTTTGAAAGACCCCAA
501  CGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGCGGTACCGGAGGGAGCATG
601  GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGTG
701  AGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTACGG
801  CGTGCACTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACATCCAGGAGCGCACCATCTTCTTC
901  AAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACG
1001 GCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACGCGTGACCAACTGACTGAAGAGCAGATCGCAGAATTTAAAGAGGCTTTCTCCCTATTGACAAGGA
1101 CGGGGATGGGACAATAACAACCAAGGAGCTGGGGACGGTGATGCGGTCTCTGGGGCAGAACCCACAGAAGCAGAGCTGCAGGACATGATCAATGAAGTA
1201 GATGCCGACGGTGACGGCACAATCGACTTCCCTGAGTTCTTGACAATGATGGCAAGAAAAATGAAAGACACAGACAGTGAAGAAGAAATTAGAGAAGCGT
1301 TCCGTGTGTTTGATAAGGATGGCAATGGCTACATCAGTGCAGCAGAGCTTCGCCACGTGATGACAAACCTTGGAGAGAAGTTAACAGATGAAGAGGTTGA
1401 TGAAATGATCAGGGAAGCAGACATCGATGGGGATGGTCAGGTAAACTACGAAGAGTTTGTACAAATGATGACAGCGAAGTGAAGGATCC

```


6.2.9 Sequenz von SV40NLS-GCaMP3.0 (nucGCaMP3.0)

```

001      TCTAGACCACCATGCCGAAGAAGAAGCGCAAGGTGATCATGGGTTCTCGTCATCATCATCATGGTATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCG
101      GGATCTGTACGACGATGACGATAAGGATCTCGCCACCATGGTGCAGTCTACACGTCGTAAGTGAATAAGACAGGTCACGCAGTCAGAGCTATAGGTCGG
201      CTGAGCTCACTCGAGAACGTCTATATCAAGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGCGTGC
301      AGCTCGCCTACCACTACCAAGCAGAACACCCCCATCGCGCAGCGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCGTGCAGTCCAACTTTTCGAAAGA
401      CCCCACGAGAAGCGCGATCAGATGGTCTGTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGGCGGTACCGGAGGG
501      AGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACAGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCG
601      AGGGTGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGAC
701      CTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGTACCCCGACCATGAAGCAGCAGCAGTTCCTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACATCCAGGAGCGCACCATC
801      TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGG
901      AGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACGGTGACCAACTGACTGAAGAGCAGATCGCAGAATTTAAAGAGGCTTTCTCCCTATTGTA
1001     CAAGACGGGGATGGGACAATAACAACCAAGGAGCTGGGGACGGTGATGCGGTCTCTGGGGCAGAACCCACAGAAGCAGAGCTGCAGGACATGATCAAT
1101     GAAGTAGATGCCGACGGTGACGGCACAATCGACTTCCCTGAGTTCCTGACAATGATGGCAAGAAAAATGAAAGACACAGACAGTGAAGAAGAAATTAGAG
1201     AAGCGTTCCGTGTGTTTGATAAGGATGGCAATGGCTACATCAGTGACGAGAGCTTCGCCACGTGATGACAAACCTTGAGAGAGAAGTTAACAGATGAAGA
1301     GGTGTGATGAAATGATCAGG GAAGCAGACATCGATGGGGATGGTCAGGTAACTACGAAGAGTTTGTACAAATGATGACAGCGAAGTGAGCGGATCC

```

6.3 Sequenzalignments

Sequenzalignments wurden mit Hilfe der Anwendung „lalign“ erstellt. (Pearson et al., 1997; <http://xylian.igh.cnrs.fr/bin/lalign-guess.cgi>).

6.3.1 Histaminrezeptor H1 (Hrh1)

Teile der Nukleotidsequenzen von hHrh1 (schwarz) und mHrh1 (rot) wurden miteinander verglichen. Die Sequenzabschnitte, an die die Primer binden, die zum Nachweis von Hrh1-Transkripten in cDNA aus HEK293-Zellen verwendet wurden (vgl. 3.4.1, Tab. 6-2), wurden in den Sequenzen durch Unterstreichung markiert.

```

1500      1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590
-   CATCAAGTTTACTTGGAAAGAGGCTCCGCTCGCATTCAGACAGTATGTATCTGGGTTGCACATGAACCGCGAAAGGAAGGCCGCCAACAGTTGGGTTTT
    : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-   CATCAAAGTCACCTGGAAGAGGCTTCGCTCACATTCCAGACAGTATGTGTCCGGGTGCACTTGAACCGAGAGCGGAAGGCAGCCAGCAGTTGGGTTGT
    1410      1420      1430      1440      1450      1460      1470      1480      1490      1500

1600      1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680      1690
-   ATCATGGCAGCCTTCATCCTCTGCTGGATCCCTTATTTCACTCTTCTTCATGGTCATTGCCTTCTGCAAGAAGTGTGCAATGAACATTGTCACATGTTCA
    : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-   ATCATGGCAGCATTCACTCTCTGCTGGATTCCCTATTTCACTCTTCTTCATGGTCATTGCCTTCTGCAACAGCTGCTGCAGCGAACCTGTGCACATGTTCA
    1510      1520      1530      1540      1550      1560      1570      1580      1590      1600

1700      1710      1720      1730      1740      1750      1760      1770      1780      1790
-   CCATCTGGCTGGGCTACATCAACTCCACACTGAACCCCTCATCTACCCCTTGTGCAATGAGAAGTCAAGAAGACATTCAAGAGAATTCTGCATATTCG
    : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-   CCATTGGCTGGGCTACATCAACTCCACGCTGAACCCCTCATCTACCCGCTGTGCAACGAGAAGTCAAGAAGACATTCAAAAAAATTCTGCACATTCG
    1610      1620      1630      1640      1650      1660      1670      1680      1690      1700

1800      1810      1820      1830      1840      1850      1860      1870      1880      1890
-   CTCCTAAGGGAGGCTCTGAGGGGATGCAACAAATG-ATC-----CTTATGATGTCCAACAGGAAATAGAGGACGAAGGCCTGTGTGTTGCCAGGCAGG
    : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-   TTCCTAAGGGCATGTCC-AAAGGATGCCACATGGTGGATAGACAACGTCTGATGTCCAAGAGGGAGCCAGAGGAAGAAAGCATGGGCGTCGCTAGACC--
    1710      1720      1730      1740      1750      1760      1770      1780      1790      1800

```

6.3.2 Histaminrezeptor H3 (Hrh3)

Teile der Nukleotidsequenzen von hHrh3 (schwarz) und mHrh3 (rot) wurden miteinander verglichen. Die Sequenzabschnitte, an die die Primer binden, die zum Nachweis von Hrh3-Transkripten in cDNA aus HEK293-Zellen verwendet wurden (vgl. 3.4.1, Tab. 6-2), wurden in den Sequenzen durch Unterstreichung markiert.

```

      430      440      450      460      470      480      490      500      510      520
_  TGCTCATCGTGGCCACGGTGTCTGGGCAACGCGCTGGTCATGCTCGCCTTCGTGGCCGACTCGAGCCTCCGCACCCAGAACAACTTCTTCTGCTCAACCT
  .....
-  TGCTCATCGTGGCCACAGTGTCTGGGCAACGCGCTGGTCATGCTCGCCTTCGTGGCGGATTTCGAGCCTCCGCACCCAGAACAACTTCTTCTGCTCAACCT
      220      230      240      250      260      270      280      290      300      310

      530      540      550      560      570      580      590      600      610      620
_  CGCCATCTCCGACTTCCTCGTCGGCGCCTTCTGCATCCCACTGTATGTACCTACGTGCTGACAGCGCGCTGGACCTTCGGCCGGGGCCTCTGCAAGCTG
  .....
-  CGCCATCTCCGACTTCCTCGTCGGGTGCCTTCTGCATCCCACTGTATGTACCTATGTGCTGACCGCGCGTTGGACCTTTGGCCGGGGCCTCTGCAAGCTG
      320      330      340      350      360      370      380      390      400      410

      630      640      650      660      670      680      690      700      710      720
_  TGGCTGGTAGTGGACTACCTGCTGTGCACCTCCTCTGCCTTCAACATCGTGTGCTATCAGCTACGACCGCTTCCTGTCGGTACCCGAGCGGTCTCATACC
  .....
-  TGGCTGGTAGTGGACTACCTGCTGTGCTCCTCAGTCTTCAACATCGTGTGCTATCAGCTATGACCGATTCTGTGCTGCTGAGCTGCTCTCCTACCT
      420      430      440      450      460      470      480      490      500      510

      730      740      750      760      770      780      790      800      810      820
_  GGGCCAGCAGGGTGACACGCGCGGCGAGTGCAGGAAGATGCTGCTGGTGTGGTGTGCTGGCCTTCCTGCTGTACGGACAGCCATCCTGAGCTGGGAGTA
  .....
-  GGGCCAGCAGGGGACACAAGACGGGCTGTTGGAAGATGGCAGTGGTGTGGTGTGCTGGCCTTCCTGCTGTATGGGCTGCCATCCTGAGTTGGGAGTA
      520      530      540      550      560      570      580      590      600      610

      830      840      850      860      870      880      890      900      910      920
_  CCTGTCCGGGGGCTCCATCCCGAGGGCCACTGCTATGCCGAGTTCTTACAACTGGTACTTCCTCATCACGGCTTCCACCCCTGGAGTTCTTTACG
  .....
-  CCTGTCCGGTGGCAGCTCCATCCCGAGGGCCACTGCTATGCTGAGTTCTTACAACTGGTACTTCTCATCACGGCTTCCACCCCTGAGTTCTTACCA
      620      630      640      650      660      670      680      690      700      710

      930      940      950      960      970      980      990      1000      1010      1020
_  CCCTTCTCAGCGTCACCTTCTTTAACCTCAGCATCTACCTGAACATCCAGAGGCGCACCCGCTCCGGCTGGATGGGGCTCGAGAGGCAGCCGCCCCG
  .....
-  CCCTTCTCAGCGTTACCTTCTTCAACCTCAGCATCTACCTGAACATCCAGAGGCGCACTCGTCTTCGGCTGGATGGGGGCGAGAGGCT---GGTCCAG
      720      730      740      750      760      770      780      790      800

```

6.3.3 Lck-GCaMP3.0

Die Aminosäuresequenzen der Lck-GCaMP3.0 Varianten aus Shigetomi et al. (2010, schwarz) und dieser Arbeit (rot) unterscheiden sich bzgl. einer Deletion an Position 41.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
_  MGCGCSSNPEDDWMENIDVCENCHYPPKLRIDPPDLATMRGSHHHHHHGMASMTGGQMGRLYDDDDKDLATMVDSSRRKWNKTGHAVRAIGRLSSLE
  .....
-  MGCGCSSNPEDDWMENIDVCENCHYPPKLRIDPPDLATM-GSHHHHHHGMASMTGGQMGRLYDDDDKDLATMVDSSRRKWNKTGHAVRAIGRLSSLE
      10      20      30      40      50      60      70      80      90

      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
_  NVYIKADKQKNGIKANFKIRHNIEDGGVQLAYHYQNTPIGDGPVLLPDNHYLSVQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKGGTGGSMVSK
  .....
-  NVYIKADKQKNGIKANFKIRHNIEDGGVQLAYHYQNTPIGDGPVLLPDNHYLSVQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKGGTGGSMVSK
      100      110      120      130      140      150      160      170      180      190

      210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
_  GEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGLKTLKFICTTGKLPVWPPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMQHDFFKSAMPEGYIQTERTIFFKDD
  .....
-  GEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGLKTLKFICTTGKLPVWPPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMQHDFFKSAMPEGYIQTERTIFFKDD
      200      210      220      230      240      250      260      270      280      290

      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
_  GNYKTRAEVKEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNTRDQLTEEQIAEFKAEFSLFDKDGDTITTKELGTVMSRLGQNPTEAELQDMINEVDAD
  .....
-  GNYKTRAEVKEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNTRDQLTEEQIAEFKAEFSLFDKDGDTITTKELGTVMSRLGQNPTEAELQDMINEVDAD
      300      310      320      330      340      350      360      370      380      390

      410      420      430      440      450      460      470      480      490
_  GDGTIDFPFELTMMARKMKDTSDEEIREAFRVFDKNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK
  .....
-  GDGTIDFPFELTMMARKMKDTSDEEIREAFRVFDKNGYISAAELRHVMTNLGEKLTDEEVDEMIREADIDGDGQVNYEEFVQMMTAK
      400      410      420      430      440      450      460      470      480

```

6.4 Ca^{2+} -Titration von GECI

Die folgenden Kreuzverdünnungsreihen wurden ausgehend von einem Volumen von 1000 μl in einer Quarzglasküvette durchgeführt. Die aus den Verdünnungsschritten resultierende $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ wurden mit WEBMAXC Standard (<http://www.stanford.edu/~cpatton/maxc.html>) kalkuliert.

Tab. 6-5: Kreuzverdünnungsreihe zur Ca^{2+} -Titration von GECI bei pH 7,2.

CaEGTA [mM]	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ [μM]	Volumen, das aus der Küvette entnommen und ersetzt wird [μl]
0,00	0,000	1000
1,0	0,017	100
2,0	0,038	111
3,0	0,065	125
4,0	0,100	143
5,0	0,150	166,5
6,0	0,225	200
7,0	0,351	250
8,0	0,602	333,5
8,6	0,938	300
8,95	1,350	250
9,48	2,700	500
9,74	5,500	500
9,87	13,96	500
10,0	39,00	1000

Tab. 6-6: Kreuzverdünnungsreihe zur Ca^{2+} -Titration von GECI bei pH 7,6.

CaEGTA [mM]	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}} [\mu\text{M}]$	Volumen, das aus der Küvette entnommen und ersetzt wird [μl]
0,00	0,000	1000
4,1	0,017	410
6,1	0,038	339
7,3	0,065	308
8,0	0,100	259
8,6	0,150	300
9,0	0,225	286
9,3	0,351	300
9,6	0,602	429
9,7	0,852	250
9,8	1,200	333
9,91	2,700	550
9,96	5,500	555
10	17,00	1000

Tab. 6-7: Kreuzverdünnungsreihe zur Ca^{2+} -Titration von GECI bei pH 8,0.

CaEGTA [mM]	$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}} [\mu\text{M}]$	Volumen, das aus der Küvette entnommen und ersetzt wird [μl]
0,00	0	1000
8,02	0,017	802
9,01	0,038	500
9,40	0,065	394
9,60	0,100	333
9,73	0,150	325
9,82	0,225	333
9,88	0,351	333
9,93	0,602	417
9,95	0,938	286
9,97	1,350	400
9,99	2,700	957
10,0	11,30	1000

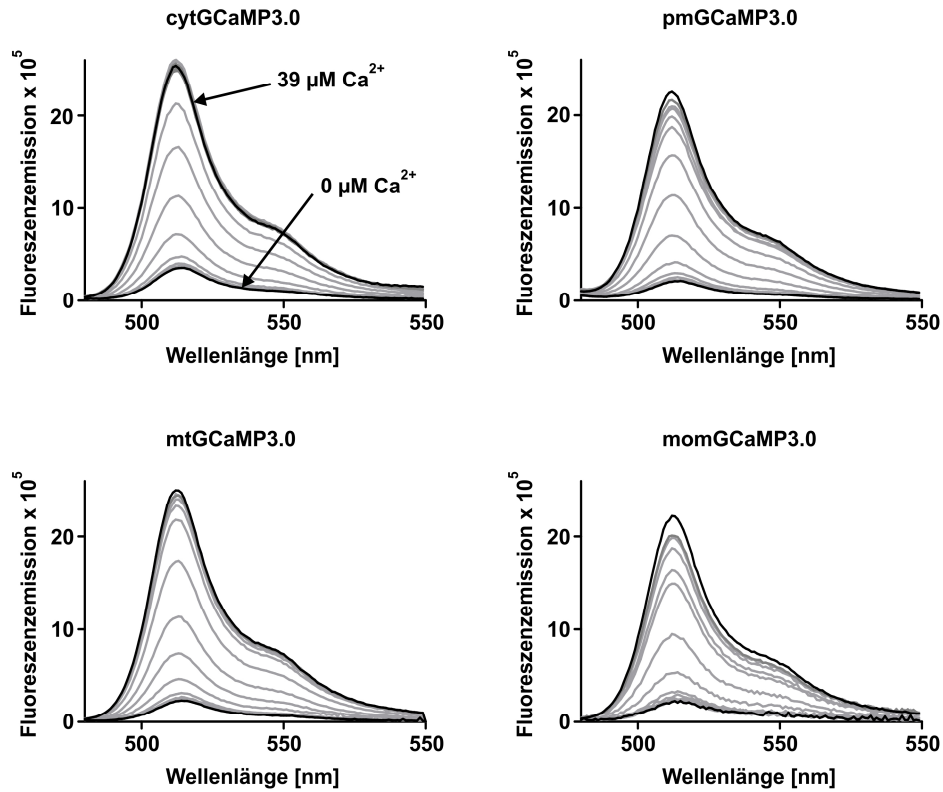


Abb. 6-1: In vitro Charakterisierung der GCaMP3.0 Varianten. Die gereinigten Proteine wurden in Messpuffer verdünnt (2 μM Protein in 30 mM MOPS, 100 mM KCl mit 10 mM CaEGTA bzw. 10 mM K2EGTA; pH 7,2) und die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ der Lösung schrittweise erhöht. Für jede GCaMP3.0 Variante und $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ wurde das Fluoreszenzemissionsspektrum bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm aufgezeichnet. Die Spektren, die bei 0 μM und 39 μM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{frei}}$ gemessen wurden, sind schwarz hervorgehoben. Die Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenzintensität hatte ein Maximum bei 510 nm.

Tab. 6-8: EC₅₀-Werte der modifizierten GCaMP3.0 Varianten für Ca^{2+} [nM]

cytGCaMP3.0	nucGCaMP3.0	pmGCaMP3.0	mtGCaMP3.0	momGCaMP3.0	GCaMP3.0-28aa-CaaX
255	284	389	274	339	499
262	297	246	262	272	534
243	268	229	238	249	534
247	295	223	281	314	602
217		242	261		
231		234			
279					
195					
202					
207					

6.5 Charakterisierung von GCaMP3.0 Varianten in HEK293-Zellen

Tab. 6-9: Dauer bis zur Detektion des ersten Fluoreszenzsignals in HEK293-Zellen nach Stimulation mit Histamin.

His [μM]	Fluo-4			cytGCaMP3.0			nucGCaMP3.0			pmGCaMP3.0			mtGCaMP3.0			momGCaMP3.0		
	SB	±	SD	SB	±	SD	SB	±	SD	SB	±	SD	SB	±	SD	SB	±	SD
	[s]		n	[s]		n	[s]		n	[s]		n	[s]		n	[s]		n
0,1	51		6	21		53	46		28	46		11	41		5	45		10
	± 7			± 4			± 9			± 9			± 10			± 8		
0,5	35		35	27		167	36		81	29		52	38		60	37		6
	± 5			± 11			± 9			± 6			± 10			± 10		
1,0	36		100	24		194	31		97	27		51	20		46	36		62
	± 5			± 4			± 8			± 5			± 4			± 6		
10	26		132	17		186	22		112	18		53	25		68	27		86
	± 3			± 2			± 4			± 3			± 6			± 5		
100	22		138	17		179	17		101	17		46	16		77	20		86
	± 3			± 2			± 2			± 5			± 8			± 4		

SB = Zeit bis zur Signaldetektion; s = Sekunde; His = Histamin; SD = Standardabweichung

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Arnd Baumann für die Bereitstellung des Themas. Ich danke ihm außerdem für die hervorragende Betreuung und die zahlreichen, wertvollen Gespräche.

Ich danke Doris Höppner-Heitmann für die Konstruktion der in dieser Arbeit verwendeten Perfusionskammer.

Bei Anne Guenther und Nadine Gruteser möchte ich mich für die großartige Teamarbeit bei der Virenproduktion bedanken.

Sabine Balfanz danke ich, für all die kleinen und großen Hilfen im Laboralltag. Danke auch für die vielen guten Gespräche.

Dr. Johnny Hendriks danke ich für die Erstellung von Excelmakros zur Datenauswertung.

Bei Petra Thelen möchte ich mich für die Hilfe in der Zellkultur bedanken.

Ich bedanke mich bei Dr. Thomas Gensch für die Unterstützung rund ums Ca^{2+} Imaging.

Bei Dr. Wienke Lange aus dem ICS-8 bedanke ich mich für die Bereitstellung von Primärzellkulturen.

Ich möchte mich weiterhin bei allen Mitarbeitern des ICS-4 für die schönen Stunden und anregenden Gespräche bedanken, die die letzten Jahre sehr bereichert haben. Insbesondere möchte ich mich noch bei Arne Franzen, Christoph Aretzweiler und Nadine Jordan bedanken, die einem immer mit Rat und Tat zur Seite stehen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Kloppenburg für die Beurteilung dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. Korsching für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes, sowie Katrin Schrader dafür, dass sie sich als Schriftführerin zur Verfügung stellt.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt meiner Familie und meinem Freund Stefan Kempmann für den endlosen Rückhalt, der mir immer wieder geboten wurde.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut und Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Arnd Baumann betreut worden.

Teilpublikationen liegen nicht vor.

Datum, Unterschrift

Jül-4369
Februar 2014
ISSN 0944-2952